

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА  
ШЕВЧЕНКА

**РАЄЦЬКА ЯНА БОРИСІВНА**

УДК: 616.329-001.37-053

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ  
ЗА ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ**

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

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

**Науковий консультант** доктор біологічних наук, професор  
**Остапченко Людмила Іванівна,**  
Київський національний університет імені  
Тараса Шевченка МОН України,  
директор ННЦ «Інститут біології та медицини»

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Калінін Ігор Васильович,**  
Національний педагогічний університет  
імені М.П. Драгоманова МОН України,  
завідувач кафедри хімії

доктор біологічних наук, старший науковий  
співробітник

**Король Леся Вікторівна,**  
Державна установа "Інститут нефрології  
Національної академії медичних наук України"  
завідувач лабораторії біохімії

доктор медичних наук, професор  
**Заїчко Наталія Валентинівна,**  
Вінницький національний медичний університет  
ім. М.І. Пирогова МОЗ України,  
завідувач кафедри біологічної та загальної хімії

Захист дисертації відбудеться «17» грудня 2019 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

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

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.  
Автореферат розісланий «15» листопада 2019 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24

Н.Г. Ракша

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я опіки займають третє місце серед інших травм. Актуальність проблеми хімічних опіків стравоходу (ХОС) визначається порівняно високою частотою використання їх у побуті [Шкляр А., 2018; Супрун У., 2019], тяжкістю опікової травми, складністю і тривалістю лікування таких хворих, частою інвалідизацією та високою летальністю [Colton B. Nielson, 2017]. За видом агента, що викликає ХОС найчастіше розрізняють: лужні та кислотні [Marcus Hollenbach, 2019]. Тяжкість ХОС залежить від кількості та концентрації вжитої хімічної речовини [Ramy D Abaskharoun, 2007].

Опіки супроводжуються запальною реакцією [Boehm J., 2010; Friedrich E.E., 2014], розвитком синдрому ендогенної інтоксикації [Голубєв А.М., 2012; Козинець Г.П., 2017; Акрінар Кара У., 2017] порушенням функціонування про-антиоксидантної системи [Netyukhaylo L.G, 2016]. Внаслідок цих процесів відбувається порушення регенеративних механізмів в тканинах стравоходу та перехід процесу загоєння в хронічну форму [Colton B. Nielson, 2017], з формуванням надлишкової грануляційної тканини, часто з розвитком надмірного фіброзу, що призводить до рубцевої контрактури [Козинець Г.П., 2006; Christopher Auger, 2017], втрати повноцінних функцій органу [Pastar I., 2014; Dhopte A., 2015], аденокарциноми стравоходу [Zhao J., 2007; Breton J., 2008; Calabrese C., 2011; Шахмамедов Н., 2012; Todd W. Costantini, 2015]. Процеси протеолізу мають безпосереднє відношення до реакцій запалення та деструкції тканин [Sheriff S., 2012; Colton B. Nielson, 2017; Іліка В.В., 2018] і є необхідною умовою нормального перебігу регенерації [Портнова М.М., 2017].

Актуальність роботи зумовлена потребою вивчення молекулярно-біохімічних механізмів перебігу регенеративних процесів за умов ХОС, які детермінують виникнення післяопікових ускладнень. Відомо, що за умов опікової травми відбувається надлишкова активація системи протеолізу [Агапова Ю.Р., 2012; Colton B. Nielson, 2017], що є однією з патогенетичних ланок у розвитку деструктивних та запальних процесів [Сидельникова В.И., 2015; Іліка В.В., 2018]. Роль порушень у системі протеолізу та взаємопов'язаних біохімічних процесів, що супроводжують процеси загоєння тканин, за умов ХОС різного генезу залишається невизначеною. Отримання експериментальних даних щодо дослідження зазначених вище проблем дало б змогу оцінити характер перебігу регенеративних процесів за опіку стравоходу різного походження та, відповідно, розробити ефективні методи спрямованої корекції протеолізу.

У цьому аспекті важливим є пошук нових біомаркерів, які утворюються за ХОС, що може сприяти більш глибокому розумінню механізмів загоєння ран та контролю перебігу ранового процесу [Brett A Chromy, 2013; Nahm G., 2014].

Не менш актуальною на сьогодні вважається проблема пошуку нових лікарських речовин з комплексними властивостями для швидшого загоєння

опікової рани та попередження відповідних ускладнень. Перспективним є використання природних нетоксичних антиоксидантів у якості цитопротекторів [Liaudanskas M., 2014]. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками, потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищати рану від бактеріальних інфекцій [Берегова Т.В., 2010; Alov P., 2015; Tsyryuk O.I., 2016; Taburets O., 2016; Dranitsina A.S. 2017]. Аналіз сучасної літератури дозволяє стверджувати, що можливими перспективними засобами нормалізації процесу загоєння за ХОС є речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. Однією з таких речовин є меланін, продуцентом якого є дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, які висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез [Чижанська Н., 2007; Голишкін Д., 2015].

Виходячи з цього, важливим є з'ясування ролі процесів протеолізу в молекулярно-біохімічних механізмах, що супроводжують процеси загоєння слизової оболонки стравоходу за ХОС та експериментальне обґрунтування доцільності застосування меланіну для корекції репаративних процесів за цих умов.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в Навчально-науковому центрі «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в 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 та задачі дослідження.** Метою роботи було з'ясувати роль процесів протеолізу в молекулярно-біохімічних механізмах ушкодження та репарації слизової оболонки стравоходу за умов хімічного опіку.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

1. Вивчити особливості метаболічних процесів за хімічного опіку стравоходу в щурів.
2. Проаналізувати вклад запального процесу та оксидативного стресу за хімічного опіку стравоходу щурів.
3. Оцінити протеолітичний баланс сироватки/плазми крові за хімічного опіку стравоходу.
4. Проаналізувати стан системи протеолізу у слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу.
5. Дослідити вплив меланіну на біохімічні процеси, які супроводжують хімічний опік стравоходу.
6. З'ясувати вплив меланіну на перебіг процесів протеолізу в біохімічних механізмах загоєння хімічного опіку стравоходу.

**Об'єкт дослідження:** система протеолізу крові та тканини слизової оболонки стравоходу за експериментальної моделі лужного та кислотного опіку та за умов введення меланіну.

*Предмет дослідження:* функціонування ключових компонентів системи протеолізу крові та слизової оболонки стравоходу за експериментальної моделі лужного та кислотного опіку II ступеня тяжкості та за умов введення меланіну.

**Методи дослідження:** хроматографічні (отримання фракції трипсиноподібних серинових протеїназ), електрофоретичні (аналіз білкових фракцій сироватки крові, якісного складу трипсиноподібних серинових протеїназ), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (оцінка рівня експресії генів *Ptgs2*, *Tgfb1*), імуноферментний аналіз (вміст інтерлейкінів, матриксних металопротеїназ (ММП), тканинного інгібітора металопротеїназ-1 (ТІМП-1), основного фактору росту фібробластів (ФРФ), IgG, аналіз вмісту шаперонів Hsp60 та Hsp70), преципітації (вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)), цитологічні (аналіз клітин крові), гістологічні (дослідження тканин стравоходу), спектрофотометричні (вміст дієнових кон'югатів (ДК), загальноклінічні та біохімічні показники крові, загальна протеолітична активність, активність протеїназ та їх інгібіторів, вміст молекул середньої маси (МСМ), активність ферментів про- та антиоксидантної системи (АОС), продукти вільнорадикального окиснення ліпідів, окисна модифікація білків, концентрація білка); флуориметричні (активність протеасом, вміст окисненого та відновленого глутатіонів, вмісту шифових основ) та статистичні методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Результати, представлені в дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди на функціонування біохімічних механізмів за ХОС. Встановлено підвищення рівня прозапальних цитокінів після опіку на тлі дефіциту протизапальних цитокінів, що супроводжувалося підвищенням концентрації IgG та вмісту середньо- і низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів. Зміни цитокінового профілю співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани. Виявлені суттєві порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, а саме підвищення рівня продуктів окиснення ліпідів і білків та дисрегуляція антиоксидантних ферментних систем, що призводить до зміни активності протеїназ та їх інгібіторів за дії ХОС. Показано зміни в протеолітичному профілі сироватки крові та кількісні зміни вмісту білкових фракцій за ХОС. Відмічено зменшення вмісту альбумінової фракції, зростання вмісту глобулінової фракції відносно контролю. Встановлено, зростання рівня  $\alpha 2$ -макроглобуліну та активності серинових і металопротеїназ в плазмі крові. Доведено, що за опіку стравоходу відбувається протеолітична деградація білків слизової оболонки стравоходу, яка полягає у зміні співвідношення кількісного вмісту білкових фракцій, зростанні вмісту ТІМП-1, фактору росту фібробластів, МСМ та всіх досліджуваних ММП, що впливає на накопичення білків міжклітинного матриксу та порушує баланс в системі протеолізу.

Уперше ідентифіковано в кровотоці білкові молекули, що дають змогу деталізувати процеси загоєння ХОС та можуть бути використанні в якості діагностичних та прогностичних маркерів розвитку та протікання цього патологічного процесу.

Розроблено концептуальну схему щодо встановлення основних біохімічних механізмів за ХОС та запропоновано засоби корекції, які можуть бути ефективними при лікуванні післяопікових ускладнень.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані в роботі результати мають фундаментальне значення та розширюють уявлення щодо розуміння процесів протеолізу в молекулярно-біохімічних механізмах ушкодження та регенерації слизової оболонки стравоходу за умов хімічного опіку.

Також показано позитивний вплив меланіну на певні ланки біохімічних, гістологічних шляхів, запальний процес та окисно-антиоксидантну рівновагу за ХОС. Доведено коригуючий вплив меланіну на баланс між протеїназами і їх інгібіторами у плазмі крові та слизовій оболонці стравоходу, що призводить до нормалізації метаболічних функцій та регенеративних процесів в організмі щурів, що зазнали ХОС.

Отримані дані можуть бути використані для пошуку нових біохімічних маркерів, які допоможуть у визначенні тяжкості стану хворого після отримання ХОС, а також рекомендування меланіну для корекції післяопікових ускладнень.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, виконаним автором відповідно до вищезазначених наукових програм ННЦ «Інститут біології та медицини». Пошукачем самостійно обґрунтовано мету та завдання роботи, розроблено методологію експериментальних досліджень, проведено пошук і аналіз даних літератури, що дало змогу висвітлити власні ідеї автора, покладені в основу дисертаційної роботи. Автор зробив основний особистий внесок у дисертаційну роботу на всіх етапах її практичного виконання, обговорення та узагальнення результатів дослідження, формулювання висновків та написання статей і тез доповідей. Науковий консультант доктор біологічних наук, професор Остапченко Л.І. брала безпосередню участь у визначенні напряму досліджень, обговоренні отриманих результатів і висновків. Здобувач вдячний за допомогу в проведенні досліджень колегам, співучасть яких у виконанні роботи зазначено в спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи було представлено на національних та міжнародних науково-практичних форумах: IX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013), VII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012), 7<sup>th</sup> of Experimental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013), XI Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2013), 38<sup>th</sup> FEBS Congress (Saint Petersburg, 2013), VI Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2014), XII International Scientific Conference of Student and Young Scientists «Shevchenkivska vesna: live science» (Kyiv, 2014), X Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014), 39<sup>th</sup> FEBS EMBO Conference (Paris, France 2014), X Міжнародній конференції

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

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 57 наукових праць, серед них 23 статті у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України (8 публікацій у виданнях, що включені до міжнародних наукометричних баз даних), а також 34 тези доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень з їх обговоренням, узагальнення, висновків, списку використаних літературних джерел (418 посилань). Дисертаційна робота викладена на 315 сторінках, містить 43 рисунки та 54 таблиці.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Матеріали та методи досліджень**

Досліди проводили на 852 білих нелінійних статевонезрілих щурах масою 90-110 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію з дотриманням міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин згідно з «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і, погодженими з положеннями «European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose» (Страсбург, Франція, 1986) і у відповідності до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Прилади, використані для наукових досліджень, метрологічно повірені.

ХОС моделювали таким чином: вводили зонд у стравохід запаяним нижнім кінцем і отвором на відстані 2 мм від нього. Зонд вводили на глибину 4 см від верхніх різців щура та повільно вводили розчини. Лужний опік стравоходу (ЛОС) моделювали, використовуючи розчин 20% NaOH, кислотний опік стравоходу (КОС) відтворювали шляхом введення 30% трихлорооцтової

кислоти ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ), що відповідає II ступеню опікового ураження. Контрольним шурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій. Тварин виводили з експерименту на 7, 15 та 21 добу. Всі больові процедури та операції проводились під загальним наркозом із застосуванням тіопенталу натрію (BiochemieGmbH/Austria). Вибір термінів дослідження обумовлений розвитком патоморфологічних процесів за хімічних опіків стравоходу [Фисталь Е, 2004]. Сироватку крові отримували згідно [Luka С, 2013]. Гомогенати слизової оболонки стравоходу отримували відповідно до рекомендацій [Рибальченко В, 1988]. Визначення біохімічних показників (загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну, іонів натрію, іонів калію, хлоридів, магнію, кальцію, аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, лужної фосфатази) у сироватці крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 (Німеччина) з використанням відповідних тест-наборів. Визначення вмісту шифових основ та ДК оцінювали спектро(флуори)метрично в гептан-ізопропанольному екстракті [Гаврилов В.Б., 1988; Колесова О.Е., 1984]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Стальная И., 1977]. Супероксиддисмутазу (СОД) (КФ 1.15.1.1) та каталазу (КФ 1.11.1.6) активності визначали відповідно до методів [Сирота Т.В., 1999; Королюк М., 1988]. Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначали флуориметричним способом із використанням ортофталевого альдегіду [Hissin P., 1976]. Активність глутатіонзалежних ферментів визначали згідно з [Власова С.Н., 1990; Разыграев А., 2004]. Визначення активності NO-синтази (КФ 1.14.13.39) засноване на комбінації класичного методу [Salter M., 1991] та його модифікації [Chin Y., 1999], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання кінцевого продукту реакції – L-цитруліну. Визначення концентрації білка проводили за методом [Bradford M., 1976]. Вміст ЦК у сироватці крові визначали методом диференційованої преципітації: високомолекулярні ЦК – з використанням 3% розчину поліетиленгліколю (ПЕГ), середньомолекулярні – 4,5% ПЕГ, низькомолекулярні – 6% ПЕГ з М.м. 6000 дальтон [Передерий В.Г., 1995]. Кількісний та якісний склад білкових фракцій сироватки крові щурів досліджували за допомогою методу диск-електрофорезу за присутності додецилсульфату натрію [Laemmli U., 1970]. Фракціонування трипсиноподібних серинових протеїназ плазми крові проводили методом афінної хроматографії, використовуючи в якості сорбенту бензамедін-сефарозу [Magdeldin S., 2012]. Для аналізу отриманої фракції трипсиноподібних серинових протеїназ плазми крові та наявності ММП у тканинах слизової оболонки стравоходу використовували метод ензим-електрофорезу [Ostapchenko L., et al, 2011]. Загальну протеолітичну активність аналізували методом визначення казеїнолітичної активності. Для селективного визначення активності металопротеїназ та серинових протеїназ до реакційної суміші додавали до кінцевої концентрації 2мМ етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) або 2 мМ фенілметилсульфоніл флуорид (ФМСФ), відповідно [Hummel В., 1959]. Визначення інгібіторної активності  $\alpha$ 1-антитрипсину

( $\alpha$ 1-АТ) та  $\alpha$ 2-макроглобуліну ( $\alpha$ 2-МГ) проводили за методом [Нартикова В., 1979]. Оцінку протеасомної активності проводили спектрофлуориметрично за методом [Kirk C. J., 2014]. Вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ТІМП-1, ФРФ, IgG, про- і протизапальних цитокінів та вміст шаперонів визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу [Crowther J. R., 2001] з використанням відповідних первинних моноклональних антитіл (Santa Cruz Biotechnology”, США) та вторинних анти-видових антитіл, коньюгованих з пероксидазою хрому (Sigma, США). Визначення вмісту МСМ проводили за методом [Габриелян Н., 1982]. У роботі використовували гістологічні методи дослідження [Лили Р., 1969]. Експресію генів у лейкоцитах крові та слизовій оболонці стравоходу визначали методом ПЛР зі зворотною транскрипцією. Екстракцію РНК проводили фенольним методом [Chomczynski P., 1987]. Отримання ДНК та полімеразну ланцюгову активність визначали згідно з [Maniatis T., 1984]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0 та TotalLab 2.10. Основні статистичні показники підраховували шляхом обчислення середнього арифметичного значення (M), стандартної середньої арифметичної похибки (m). Різницю показників оцінювали параметричними методами варіаційної статистики ANOVA. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Ст'юдента (t). При цьому достовірними вважались різниці при  $p < 0,05$  [Брандт Т., 1975].

### Результати досліджень та їх обговорення

**Метаболічні процеси за хімічного опіку стравоходу в щурів.** Одним з основних діагностичних критеріїв тяжкості ХОС є визначення біохімічних показників сироватки крові, що корелюють з функціональним станом організму та ступенем метаболічних порушень за досліджуваної патології [Karaman İ., 2015; Öztogun Sİ., 2016]. Було визначено основні біохімічні показники у сироватці крові за умов ЛОС та КОС. За обох типів ХОС спостерігалось зниження концентрації загального білка та альбуміну, підвищення продуктів азотистого обміну сечовини та креатиніну, підвищення активності АСТ, АЛТ та лужної фосфатази, змінювались показники іонного обміну. Таким чином, показані особливості метаболічних процесів у крові щурів за ЛОС та КОС, які свідчать про глибокі зміни у функціонуванні основних систем та органів за розвитку патологічних наслідків ураження стравоходу.

**Запальний процес за хімічного опіку стравоходу щурів.** За ХОС відбувається утворення активних форм кисню, вільні радикали спричиняють активацію транскрипційних факторів AP-1 та NF-kB, ці фактори регулюють секрецію сигнальних молекул, таких як цитокіни, хемокіни та фактори росту. На опікову травму організм відповідає неспецифічною запальною реакцією, яка проявляється підвищенням синтезу цитокінів [Zhou, H., 2012; Paunel-Görgülü A., 2012]. Вираженість цієї реакції залежить від площі та глибини ураження, характеру інфекційного агента та активності імунної

відповіді постраждалого організму. Досліджено рівні прозапальних інтерлейкінів у сироватці крові та слизовій оболонки стравоходу, до яких відносяться ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, ІФН- $\gamma$ , ІЛ-6, фактор некрозу пухлини альфа (ФНП- $\alpha$ ) (табл.1,2)

Таблиця 1

**Вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, ІФН- $\gamma$ , ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ ) та протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) (ум.од./мл) у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу (M $\pm$ m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС				
ІЛ-1 $\beta$	0,088 $\pm$ 0,001	0,104 $\pm$ 0,007*	0,110 $\pm$ 0,009*	0,091 $\pm$ 0,007
ІЛ-12	0,091 $\pm$ 0,001	0,112 $\pm$ 0,001*	0,081 $\pm$ 0,003	0,104 $\pm$ 0,007*
ІФН- $\gamma$	0,077 $\pm$ 0,004	0,091 $\pm$ 0,004*	0,088 $\pm$ 0,007	0,081 $\pm$ 0,002
ІЛ-6	0,063 $\pm$ 0,003	0,067 $\pm$ 0,001	0,063 $\pm$ 0,002	0,066 $\pm$ 0,001
ФНП- $\alpha$	0,067 $\pm$ 0,002	0,071 $\pm$ 0,002	0,063 $\pm$ 0,004	0,069 $\pm$ 0,001
ІЛ-4	0,089 $\pm$ 0,001	0,079 $\pm$ 0,001*	0,092 $\pm$ 0,001	0,105 $\pm$ 0,005*
ІЛ-10	0,078 $\pm$ 0,006	0,073 $\pm$ 0,003	0,074 $\pm$ 0,002	0,084 $\pm$ 0,003
КОС				
ІЛ-1 $\beta$	0,088 $\pm$ 0,001	0,103 $\pm$ 0,015	0,111 $\pm$ 0,001	0,092 $\pm$ 0,006
ІЛ-12	0,091 $\pm$ 0,001	0,122 $\pm$ 0,001*	0,111 $\pm$ 0,001*	0,115 $\pm$ 0,002*
ІФН- $\gamma$	0,077 $\pm$ 0,004	0,091 $\pm$ 0,007	0,085 $\pm$ 0,010	0,085 $\pm$ 0,009
ІЛ-6	0,063 $\pm$ 0,003	0,073 $\pm$ 0,004*	0,075 $\pm$ 0,004*	0,084 $\pm$ 0,003*
ФНП- $\alpha$	0,067 $\pm$ 0,002	0,079 $\pm$ 0,004*	0,074 $\pm$ 0,002*	0,075 $\pm$ 0,003*
ІЛ-4	0,089 $\pm$ 0,001	0,087 $\pm$ 0,006	0,077 $\pm$ 0,002*	0,081 $\pm$ 0,003*
ІЛ-10	0,078 $\pm$ 0,006	0,097 $\pm$ 0,001	0,069 $\pm$ 0,008	0,071 $\pm$ 0,002

\* – p<0,05 порівняно з контролем

За обох типів ХОС було встановлено достовірне підвищення прозапальних цитокінів переважно на 7 добу експерименту, що є відображенням активності й тяжкості патологічного процесу. У подальші терміни дослідження динаміка змін рівня цитокінів мала різнонаправлений характер. ІЛ-1 $\beta$  є одним із ключових цитокінів, який характеризує перебіг ранового процесу. За ЛОС рівень ІЛ-1 $\beta$  у сироватці крові був підвищеним, а саме: зростав на 7 та 15 добу на 18% та 25%, порівняно з контрольними значеннями. У слизовій оболонці стравоходу рівень ІЛ-1 $\beta$  підвищувався на 7 добу на 30% та знижувався на 15 та 21 добу, порівняно з контролем. Рівень ІЛ-1 $\beta$  за КОС був вище контрольного рівня протягом усього терміну дослідження, найбільше підвищення спостерігали на 1 добу - у 1,35 раза. На 21 добу рівень ІЛ-1 $\beta$  наближався до контрольних значень. Отримані дані узгоджуються з літературними та свідчать про активацію запального процесу у

щурів з опіком, який характеризується тривалим підвищенням вмісту ІЛ-1 $\beta$  [Поликарпова А. В., 2011].

У розвитку запального процесу важливу функцію виконує ФНП- $\alpha$ , він стимулює проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, підсилює синтез адгезивних молекул, активує синтез білків гострої фази, бере участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [Регада М.С., 2013; Kaddoura I., 2017]. Рівень ФНП- $\alpha$  за ЛОС на 7, 15 та 21 добу не зазнавав достовірних змін у сироватці крові, порівняно з контрольними значеннями. ІФН- $\gamma$  і ФНП- $\alpha$  мають виражену імуномодулюючу дію, є індукторами клітинної ланки імунітету й відносяться до основних прозапальних цитокінів. Встановлено, що в умовах ЛОС відбувалось підвищення рівня ІФН- $\gamma$  у сироватці крові на 7 добу експерименту на 18%, порівняно з контролем. У слизовій оболонці стравоходу рівень ІФН- $\gamma$  мав незначне підвищення. Вміст ІФН- $\gamma$  та ФНП- $\alpha$  за КОС на 1 добу був вище контрольного показника в 1,3 раза. На 15 та 21 добу даний показник був у 1,1 раза вище за контроль. Показано підвищення рівня ІЛ-6 за умов ХОС. Встановлено, що одним із факторів підвищення ІЛ-6 за опіку є зниження концентрації ІЛ-4, тому рівень ІЛ-4 також розглядається як прогностичний фактор виникнення ускладнень [Pileri, D., 2008; Colton V. Nielson, 2017]. Також нами були досліджені рівні за ХОС протизапальних інтерлейкінів, до яких відносяться ІЛ-4, ІЛ-10, що регулюють специфічні імунні реакції й обмежують розвиток запалення.

Таблиця 2

**Вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, ІФН- $\gamma$ , ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ ) та протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) (ум.од./мл) у слизовій оболонці стравоходу за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ , n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС			
	ЛОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ІЛ-1 $\beta$	0,102 $\pm$ 0,004	0,113 $\pm$ 0,007	0,118 $\pm$ 0,002*	0,106 $\pm$ 0,003
ІЛ-12	0,161 $\pm$ 0,003	0,265 $\pm$ 0,010*	0,166 $\pm$ 0,003	0,172 $\pm$ 0,005*
ІФН- $\gamma$	0,098 $\pm$ 0,002	0,101 $\pm$ 0,005	0,121 $\pm$ 0,008*	0,112 $\pm$ 0,008*
ІЛ-6	0,091 $\pm$ 0,005	0,151 $\pm$ 0,011*	0,166 $\pm$ 0,010*	0,141 $\pm$ 0,009*
ФНП- $\alpha$	0,111 $\pm$ 0,004	0,171 $\pm$ 0,011*	0,161 $\pm$ 0,010*	0,141 $\pm$ 0,008*
ІЛ-4	0,164 $\pm$ 0,003	0,121 $\pm$ 0,005*	0,134 $\pm$ 0,011*	0,146 $\pm$ 0,007*
ІЛ-10	0,171 $\pm$ 0,004	0,111 $\pm$ 0,005*	0,126 $\pm$ 0,004*	0,139 $\pm$ 0,008*

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

Отже, за опіку виділяється велика кількість медіаторів запалення, які активують запальний процес, що сприяє підвищенню вмісту прозапальних цитокінів після опіку при дефіциті протизапальних цитокінів. Такі зміни цитокінового профілю співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани. Встановлено підвищення рівня прозапальних цитокінів та зниження протизапальних цитокінів, що

супроводжувалося підвищенням вмісту середньо- та низькомолекулярних ЦК. Такі зміни цитокінового профілю, співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани.

**Оксидативний стрес за хімічного опіку стравоходу щурів.** Велика кількість нейтрофілів, що надходить до опікової рани, починає продукувати значну кількість активних форм кисню, який на тлі зниження активності антиоксидантних ферментів сприяє пошкодженню мембран. Це може уповільнювати процес загоєння. Істотне значення має й надмірна активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). У результаті зростання активності вільнорадикальних процесів і ослаблення антиоксидантного захисту (АОЗ) токсичні продукти накопичуються, обумовлюючи серйозні метаболічні порушення, що призводить до формування оксидативного стресу [Colton B. Nielson, 2017].

Оксидативний стрес є важливим механізмом у розвитку опікової травми, тому наступним етапом наших досліджень було визначити інтенсивність ПОЛ. Для цього визначали рівень первинних продуктів ПОЛ - ДК та вторинних – ТБК-активних продуктів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу (табл. 3, 4).

Таблиця 3

**Концентрація продуктів перекисного окиснення, активність ферментів синтази оксиду азоту, супероксиддисмутази та каталази у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС				
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	32,31±1,11	111,81±5,11*	157,31±5,61*	211,81±6,71*
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	35,11±1,11	45,71±1,81*	54,11±2,31*	49,01±2,11*
Супероксиддисмутаза, ум.од/мг*хв	0,31±0,02	0,17±0,02*	0,16±0,02*	0,24±0,02*
Каталаза, мкмоль/мг*хв	0,31±0,02	0,61±0,05*	0,81±0,03*	0,71±0,04*
eNOS, ум.од/мг*хв	0,57±0,01	0,67±0,02*	0,92±0,05*	0,62±0,05
iNOS, ум.од/мг*хв	0,65±0,03	0,81±0,03*	0,95±0,06*	0,09±0,04*
КОС				
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	32,31± 1,31	48,21±1,91*	50,91±2,31*	33,71±1,31
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	192,01±7,91	339,01±13,61*	389,01±15,61*	342,01±13,70*
Супероксиддисмутаза, ум.од/мг*хв	0,26±0,01	0,06±0,01*	0,11±0,01*	0,19±0,01*
Каталаза, мкмоль/мг*хв	7,06±0,32	3,92±0,18*	4,44±0,20*	4,71±0,21*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

Результати дослідження показали, що за ХОС щурів спостерігалось підвищення вмісту продуктів ПОЛ. Показником утворення первинних продуктів реакцій вільнорадикального окиснення ліпідів є вміст ДК. За умов ЛОС при дослідженні вмісту ДК у сироватці крові спостерігалось підвищення даного показника на 21 добу, значення перевищували контрольні в 6,5 раза. У слизовій оболонці стравоходу концентрація ДК підвищувалася за ЛОС протягом усього експерименту, максимальні значення спостерігалися на 21 добу, де показник перевищував контрольні значення за ЛОС в 6,9 раза. За умов КОС вміст ДК зростав як у слизовій оболонці стравоходу, так і у сироватці крові. Максимального значення у сироватці крові даний показник набув на 15 добу після опіку, у 1,6 раза вище за контроль. Тоді як у слизовій стравоходу найвище значення показника спостерігали на 1 добу після опіку, у 2,2 раза 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. Вторинними продуктами ПОЛ є альдегіди, зокрема малоновий, які утворюються під час розриву подвійних зв'язків у вуглецевому скелеті окиснюваних молекул. Встановлено поступове підвищення рівня ТБК-активних продуктів як у слизовій оболонці стравоходу, так і у сироватці крові за умов ХОС.

Таблиця 4

**Концентрація продуктів перекисного окиснення, активність ферментів синтази оксиду азоту, супероксиддисмутази та каталази у слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС				
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	19,51±1,41	90,11±5,90*	113,01±7,30*	134,51±6,01*
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	203,61±4,01	619,31±5,91*	469,41±7,10*	255,51±6,51*
Супероксиддисмутаза, ум.од/ мг*хв	4,81±0,31	5,21±0,31	3,21±0,10*	2,51±0,20*
Каталаза, мкмоль/мг*хв	1,11±0,21	6,61±0,51*	5,21±0,40*	2,61±0,50*
eNOS, ум.од/мг*хв	0,94±0,02	1,31±0,05*	1,44±0,08*	1,02±0,09
iNOS, ум.од/мг*хв	0,88±0,04	1,44±0,05*	1,56±0,09*	1,51±0,07*
КОС				
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	19,51±0,78	38,61±1,55*	37,21±1,49*	20,21±0,81
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	104,01±4,2	265,01±10,6*	245,01±9,8*	235,01±9,41*
Супероксиддисмутаза, ум.од/ мг*хв	0,18±0,01	0,16±0,01	0,14±0,01*	0,11±0,01*
Каталаза, мкмоль/мг*хв	3,66±0,16	2,27±0,10*	2,97±0,13*	3,21±0,14*

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

За умов ЛОС концентрація ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів упродовж усього експерименту була достовірно підвищена. На 21 добу концентрація підвищувалась в 1,4 раза за ЛОС, порівняно з контрольними значеннями. Схожі результати були отримані у слизовій оболонці стравоходу, де концентрація ТБК-активних продуктів за ЛОС була високою на 7 та 15 добу експерименту, а на 21 добу спостерігалось зниження концентрації та наближення до контрольних значень. Так на 7 добу вміст за ЛОС збільшився в 3 раза порівняно з контрольними значенням.

За умов КОС вміст досліджуваного показника у слизовій оболонці стравоходу на 7 день після опіку був вищий за контроль у 2,6 раза, а у сироватці крові на 15 добу після опіку в 2 раза. 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 раза вище за контроль у слизовій оболонці стравоходу, а у сироватці крові – у 1,8 раза.

Отримані нами експериментальні дані свідчать про те, що за даної експериментальної патології активація процесів ПОЛ починається вже з першої доби після травми. В подальшому процеси окиснення посилювались, що вказує на прогресування опікової хвороби.

У результаті окисної полімеризації ліпідів та білків утворюються кінцеві продукти ПОЛ – шифові основи. Нами виявлено поступове зростання вмісту шифових основ за КОС. Кінцеві продукти пероксидації зростали в середньому в 1,2 раза порівняно з контролем лише на 21 добу після опіку, як у сироватці крові, так і у слизовій оболонці стравоходу. Опікова хвороба збільшує утворення АФК, що призводить до пошкодження тканин. При цьому може розвиватися дисбаланс між інтенсивністю вільнорадикальних процесів і рівнем активності антиоксидантної системи (АОС), унаслідок чого посилюється окиснення біомолекул [Netyukhailo L., 2014]. Порушення нормального перебігу окиснювальних процесів, що лежать в основі метаболізму всіх клітин і визначає адаптивну спроможність організму до дії ушкоджуючих факторів, призводить до формування оксидативного стресу [Colton B. Nielson, 2017]. Отже, за КОС на тлі підвищеної активності процесів ПОЛ (ДК, ТБК-активні продукти) відзначалося достовірне пригнічення механізмів антиоксидантного захисту (АОЗ). За умов опіку розвивається порушення балансу між дією прооксидантних факторів і АОС за рахунок активації вільнорадикальних процесів.

Посилення вільнорадикальних процесів паралельно з порушеним механізмом АОЗ пов'язано зі зниженням активності СОД, каталази та системи глутатіону за опіку. Суттєві метаболічні порушення за хімічного опіку стравоходу, які обумовлені процесами надмірної продукції АФК є умовою для активації протеолізу. Опік не тільки підвищує синтез активних форм кисню, але також погіршує антиоксидантні механізми захисту, що робить пацієнтів з опіками більш сприйнятливими до АФК-опосередкованих ушкоджень клітинної ДНК та білків [Colton B. Nielson, 2017; Christopher Auger, 2017].

Оксид азоту (NO) – це міжклітинна сигнальна молекула, що активно бере участь у процесах загоєння. Антиоксидантний ефект біодоступного NO відбувається завдяки витісненню супероксиду, який є основним компонентом окисного стресу. NO також сприятливо впливає на ангіогенез, запалення, реконструкцію тканин [Kaddoura I., 2017], тому нами було визначено активність eNOS та iNOS у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС.

Активність eNOS у сироватці крові за умов ЛОС поступово підвищувалась на 7 та 15 добу на 19% та 55% відповідно, порівняно з контролем, та знижувалась на 21 добу, наближаючись до контрольних значень. У слизовій оболонці стравоходу також відмічено достовірне зростання активності ферменту на 7 та 15 добу на 35% та 60% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Активність iNOS у сироватці крові за умов опіку достовірно підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 24%, 44% та 20% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. У слизовій оболонці стравоходу активність ферменту за ЛОС також зростала на 7, 15 та 21 добу на 63%, 69% та 51% відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

За ЛОС спостерігалось підвищення активності обох ізоформ NOS, що може впливати негативно на процеси загоєння за опіку стравоходу, адже у високих концентраціях NO може мати токсичний ефект на клітини справляючи, пов'язаний із утворенням сильного окиснювача – пероксинітриту ( $\text{ONOO}^-$ ), який чинить негативний вплив на тканини, порушуючи структуру клітинних мембран, а також змінюючи енергетичний обмін у клітині та синтез ДНК [Christopher Auger, 2017].

Виявлені порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, а саме підвищення рівня продуктів окиснення ліпідів і білків та дисрегуляція антиоксидантних ферментних систем, що може призводити до зміни активності протеїназ та їх інгібіторів за дії хімічних опіків стравоходу.

**Протеолітичний баланс у слизовій оболонці за хімічного опіку стравоходу.** Функціонування ММП при нормальних та патологічних загоєннях ран активно досліджується [Безродний Б.Г., 2013, Петренко О.М., 2013]. Разом із цим, недостатньо експериментальних та клінічних даних стосовно ролі ММП у загоєнні післяопікових ран саме стравоходу. Нами було визначено вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу за ХОС (табл. 5).

У слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС вміст ММП-1 був найбільш високим на 7 добу, що перевищувало контрольні значення в 1,3 раза, вміст ММП-2 був найбільш високий на 7 та 21 добу, що перевищувало контрольні значення в 1,46 раза та 1,5 раза відповідно. За умов КОС у слизовій оболонці стравоходу вміст ММП-1 на 1 добу підвищився у 2,1 раза, на 7 добу цей показник дещо знизився, а на 15 та 21 добу вміст ММП-1 знову зростав.

Максимальне значення вмісту ММП-1 у слизовій стравоходу спостерігалось на 21 добу після опіку, у 2,2 раза вище відносно контролю. Вміст ММП-2 підвищувався на 1 та 15 добу після опіку у слизовій стравоходу у 2,2 та 2,3 раза відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Вміст

ММП-3 за ЛОС у слизовій оболонці стравоходу найбільш високим був на 7 добу, що перевищувало контрольні значення в 1,64 раза. За КОС вміст ММП-3 у слизовій оболонці стравоходу зростав протягом усього досліджуваного періоду, максимальне значення спостерігалось на 21 добу після опіку в 1,9 раза вище за контрольні значення. Вміст ММП-8 у слизовій оболонці стравоходу підвищувався лише на 7 добу після ЛОС у 1,32 раза порівняно з контролем. У слизовій оболонці стравоходу вміст ММП-9 був високий на 7 та 21 добу що перевищувало контрольні значення в 1,5 та 1,6 раза відповідно.

Таблиця 5

**Вміст матричних металопротеїназ (ум.од/мг білка) у слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС				
ММП-1	11±0,8	14,6±1,1*	13±0,9*	12±0,9
ММП-2	13±0,9	19±1,4*	16,5±1,2*	19,6±1,5*
ММП-3	11,3±0,9	18,5±1,5*	12,6±0,9	12,2±0,9
ММП-8	9,1±0,7	12±1,3*	9,8±0,9	9,2±1,1
ММП-9	12,2±0,9	18,6±1,5*	15±1,2*	19,6±1,6*
КОС				
ММП-1	14,5±0,6	21,4±0,9*	25±0,9*	31,1±1,3
ММП-2	12,8±0,5	19,2±0,8*	28,8±1,2*	26,5±1,1*
ММП-3	11,3±0,5	17,8±0,7	18,3±0,7*	21,7±0,9*
ММП-8	8,5±0,3	10,9±0,5*	11,1±0,5*	15±0,6*
ММП-9	4,5±0,2	6,7±0,3*	7,7±0,3*	7,5±0,3*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

Максимальне значення вмісту ММП-1 у слизовій стравоходу спостерігалось на 21 добу після травми, у 2,2 раза вище відносно контролю. Вміст ММП-2 підвищувався на 1 та 15 добу після опіку у слизовій оболонці стравоходу у 2,2 та 2,3 раза відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Вміст ММП-3 за ЛОС у слизовій оболонці стравоходу найбільш високим був на 7 добу, що перевищував контрольні значення в 1,64 раза. За КОС вміст ММП-3 у слизовій оболонці стравоходу постійно зростав протягом усього досліджуваного періоду, максимальне значення спостерігалось на 21 добу після опіку в 1,9 раза вище за контрольні показники. Вміст ММП-8 у слизовій оболонці стравоходу підвищувався лише на 7 добу після ЛОС у 1,32 раза порівняно з контролем. У слизовій оболонці стравоходу вміст ММП-9 був високий на 7 та 21 добу, що перевищував контрольні значення в 1,5 та 1,6 раза відповідно.

Дослідження за КОС вмісту ММП-8 у слизовій оболонці стравоходу виявило підвищення показника в 1,5 раза на 1 добу. На 7 та 15 добу вміст

ММП-8 знижувався, але залишався вище контрольних значень. Максимальне підвищення показника спостерігали на 21 добу, у 1,8 раза вище контролю. Вміст ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу зростає на 1 добу в 1,4 раза та в 1,6 раза на 7 добу після КОС. 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 раза вище контрольних значень.

Отримані результати щодо підвищення вмісту ММП-8 можуть свідчити про суттєву роль даної протеїнази в модулюванні запальної відповіді за КОС. При критичних станах відбувається порушення динамічної рівноваги між активністю протеолітичних ферментів та їх інгібіторами, що є важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань [Трохимович А.А., 2011]. Проте в літературі недостатньо даних щодо активності протеолітичних ферментів та інгібіторного потенціалу у слизовій оболонці за опікових травм стравоходу.

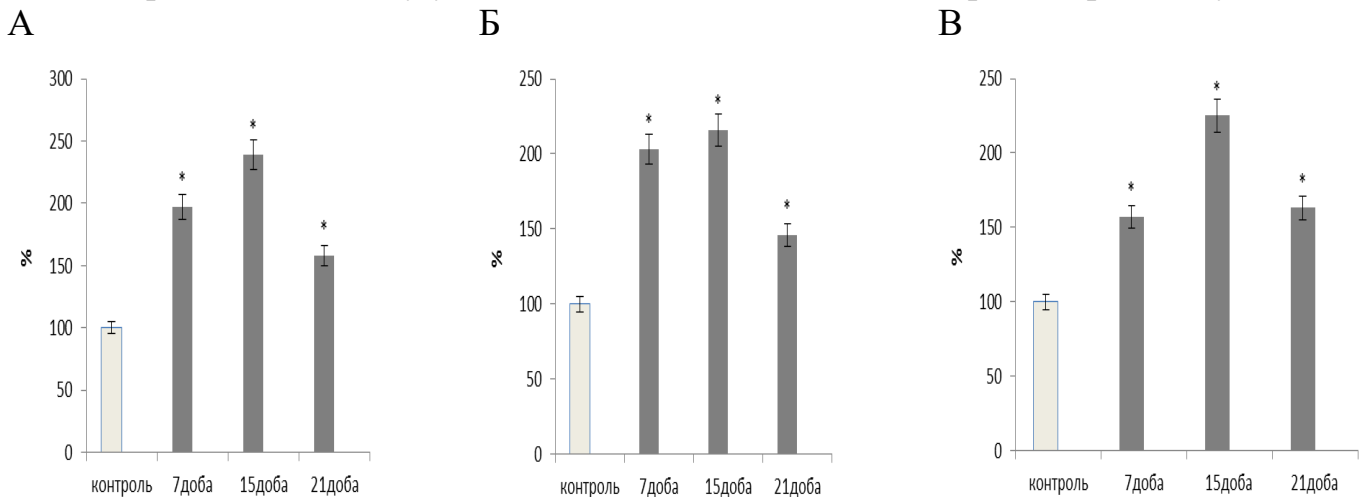


Рис. 1. Активність: загальна протеолітична (А), серинових протеїназ (Б), металопротеїназ (В) у плазмі крові щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

За умов ЛОС загальна протеолітична активність у слизовій оболонці стравоходу зростала впродовж всього експерименту порівняно з контрольними значеннями на 96%, 137%, 65% на 7, 15 та 21 доби відповідно (рис. 1). Серед протеолітичних ферментів найбільш активними при процесах загоєння є серинові та металопротеїнази. Тому нами було визначено активність серинових та металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС. При дослідженні активності металопротеїназ та серинових протеїназ у слизовій оболонці стравоходу було виявлено, що вона зростала впродовж усього експерименту порівняно з контрольними значеннями, зокрема, для серинових протеїназ на 7 добу на 102%, на 15 добу на 115%, на 21 добу на 39%, для металопротеїназ активність підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 55%, 133% та 66% відповідно. Висока активність металопротеїназ в уражених тканинах слизової оболонки стравоходу може свідчити про активний процес епітелізації ранової поверхні, особливо високі показники були на 15 добу. Цей період характеризується активним ростом колагенових волокон та посиленою секрецією

металопротеїназ для забезпечення щільності грануляційної та нормальної епітелізації тканини, у той час як високі показники активності металопротеїназ та серинових протеїназ на 21 добу за ЛОС свідчать про хронізацію запального процесу.

Нами було визначено вміст тканинного інгібітора ММП (ТІМП-1) у слизовій оболонці стравоходу після моделювання ЛОС та КОС (табл.6).

Таблиця 6

**Вміст ТІМП-1 (ум.од./мг білка) у слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС	17,4±0,8	19,8±1,2	15±0,9*	12,4±1,3*
КОС	13,9±1,2	22,1±2,1*	16,6±0,5*	21,5±4,8*

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

Вміст ТІМП-1 на 7 добу після ЛОС був вище за контрольних значень, на 21 добу знижувався в 1,4 раза, порівняно з контролем за ЛОС. На 7 добу після КОС даний показник був вище за контроль у 1,6 раза. На 15 та 21 добу вміст даного показника дещо знизився. У нормі процеси синтезу й деградації колагену в тканинах врівноважені завдяки збалансованій дії системи ММП та їх тканинних інгібіторів. Порушення процесу загоєння післяопікових ран є причиною надмірного синтезу колагену, який спричинений дисбалансом у співвідношенні ММП та ТІМП [Чернякова Г. М., 2016]. При дисбалансі протеїназ та інгібіторів із переважанням протеолітичної активності деградація білків міжклітинного матриксу триває, що свідчить про продовження хронічного запалення. Некерована протеїназна активність є одним із головних патологічних механізмів незаживаючих ран. Надмірна кількість протеїназ згубно впливає на колаген, таким чином запобігаючи формуванню рубця, а продукти розпаду стимулюють подальше запалення.

Доведено, що за опіку стравоходу відбувається підвищення загальної протеолітичної активності та активності серинових протеїназ, металопротеїназ, підвищення вмісту ММП та зниження вмісту ТІМП-1, що впливає на накопичення низькомолекулярних білків міжклітинного матриксу та свідчить про дисбаланс у системі протеолізу.

**Протеолітичний баланс сироватки/плазми крові за хімічного опіку стравоходу.** Функціонування ММП при нормальних та патологічних загоєннях ран активно досліджується [Чернякова Г. М. 2016, Christopher Auger, 2017]. Разом із цим, недостатньо експериментальних та клінічних даних стосовно ролі ММП у загоєнні післяопікових ран саме стравоходу. Нами було визначено вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 у сироватці крові за умов ХОС (табл. 7).

За умов моделювання ЛОС показано підвищення вмісту ММП-1 та ММП-2 у сироватці крові на 21 добу експерименту в 1,2 та 1,3 раза, порівняно з

контрольними значеннями. Максимальне підвищення вмісту ММП-1 у сироватці крові спостерігали на 1 добу після КОС, у 1,3 раза вище за контрольні значення. Протягом наступних проміжків часу вміст ММП-1 поступово знижувався, але залишався вище контрольних значень. Вміст ММП-2 підвищувався на 1 та 15 добу після КОС у сироватці крові – у 1,8 раза порівняно з контрольними значеннями. Вміст ММП-3 у сироватці крові підвищувався за ЛОС. Найвищі значення були на 7 добу в 1,3 раза та 21 добу в 1,3 раза порівняно з контролем.

Таблиця 7

**Вміст матриксних металопротеїназ (ум.од/мл) у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Групи щурів з КОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС				
ММП-1	10,4±0,5	9,6±0,5	10,3±0,7	12,1±0,6*
ММП-2	10,5±0,8	9,3±0,9	10,1±0,7	13,7±0,8*
ММП-3	6,7±0,2	8,8±0,4*	5,5±0,2*	8,8±0,3*
ММП-8	5,5±0,2	7,7±0,4*	5,4±0,2	7,5±0,5*
ММП-9	4,5±0,3	6,1±0,3*	6,9±0,4*	7,5±0,4*
КОС				
ММП-1	10,4±0,3	13,1±0,3*	12,1±0,3*	11,1±0,3
ММП-2	10,5±0,3	14,8±0,6*	19,1±0,8*	14,1±0,6*
ММП-3	7,9±0,2	7,7±0,3	8,4±0,3	8,5±0,3*
ММП-8	5,5±0,2	7,4±0,3*	7,2±0,3*	6,9±0,3*
ММП-9	4,5±0,2	6,7±0,3*	7,7±0,3*	7,5±0,3*

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

Вміст ММП-3 у сироватці крові суттєво не змінювався, на 21 добу показник виріс у 1,1 раза відносно контролю за КОС. За умов ЛОС підвищувався вміст ММП-8 у сироватці крові на 7 та 21 добу в 1,4 та 1,35 раза, порівняно з контролем. За КОС дослідження вмісту ММП-8 у сироватці крові були вище контрольних значень протягом усього досліджуваного періоду. Найвище значення даного показника спостерігали на 7 добу, у 1,4 раза вище за контроль.

Отримані результати щодо підвищення вмісту ММП-8 можуть свідчити про суттєву роль даної протеїнази в модулюванні запальної відповіді за КОС. Вміст ММП-9 у сироватці крові зростав упродовж всього експерименту. Найвищі показники спостерігались за ЛОС на 7, 15 та 21 добу, що перевищували контроль у 1,35; 1,5 та 1,7 раза. Подібна тенденція спостерігалась при дослідження вмісту ММП-9 за умов КОС. Вміст ММП-9 у сироватці крові був вище контрольних значень на 1 добу в 1,6 раза, а на 7 - у 1,5 раза. Найвище значення даний показник мав на 15 та 21 добу, у 1,7 раза вище за контроль. Отже, найбільше підвищення вмісту досліджуваних ММП

спостерігали на 21 добу експерименту, що може свідчити про розвиток запального процесу.

Нами було визначено загальну активність протеолітичних ферментів у плазмі крові щурів за ЛОС та КОС (рис. 2, 3). Загальна протеолітична активність у плазмі крові підвищувалась упродовж всього експерименту за ЛОС на 7, 15 та 21 добу на 294%, 254% та 295%, порівняно з контрольними значеннями.

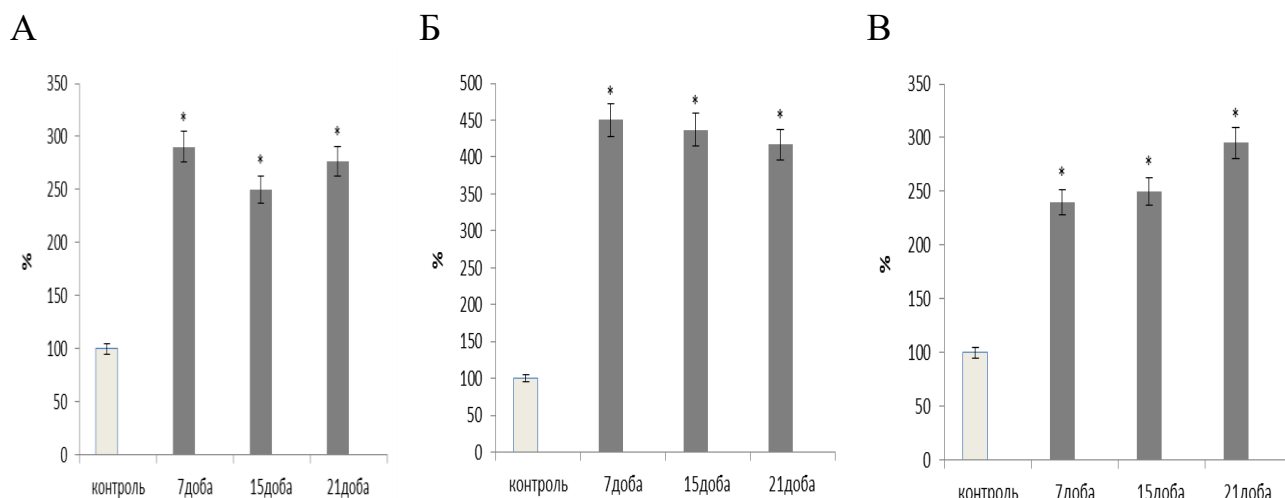


Рис. 2. Активність: загальна протеолітична (А), серинових протеїназ (Б), металопротеїназ (В) у плазмі крові щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Також ми визначили загальну активність протеолітичних ферментів у плазмі крові щурів за КОС (рис. 3). Встановлено, що на 1 та 7 добу експерименту після моделювання КОС загальна активність протеолітичних ферментів зростала в 1,4 та 2,9 рази відповідно. 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 ендогенних інгібіторів є не тільки печінка, але й клітини крові (моноцити, лімфоцити та сегментоядерні нейтрофіли) [Веремеєнко К.Н, 1993]. Одним із джерел протеїназ на 7 добу можуть бути моноцити, вміст яких за КОС підвищився, у порівнянні з контролем.

Виявлено зміни активності серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові щурів за КОС. Активність серинових протеїназ у плазмі крові підвищувалась за умов ЛОС на 7, 15 та 21 добу, в 4,7; 4,4 та 4,3 рази відповідно, порівняно з контрольними значеннями. За ЛОС спостерігалось підвищення активності металопротеїназ у плазмі крові на 7, 15 та 21 добу в 2,3; 2,3 та 2,7 рази відповідно, порівняно з контрольними значеннями (рис.2).

Визначено активність серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові щурів за КОС (рис. 3). Активність металопротеїназ у плазмі крові щурів підвищувалась поступово, 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 [Климашевич А.В., 2013].

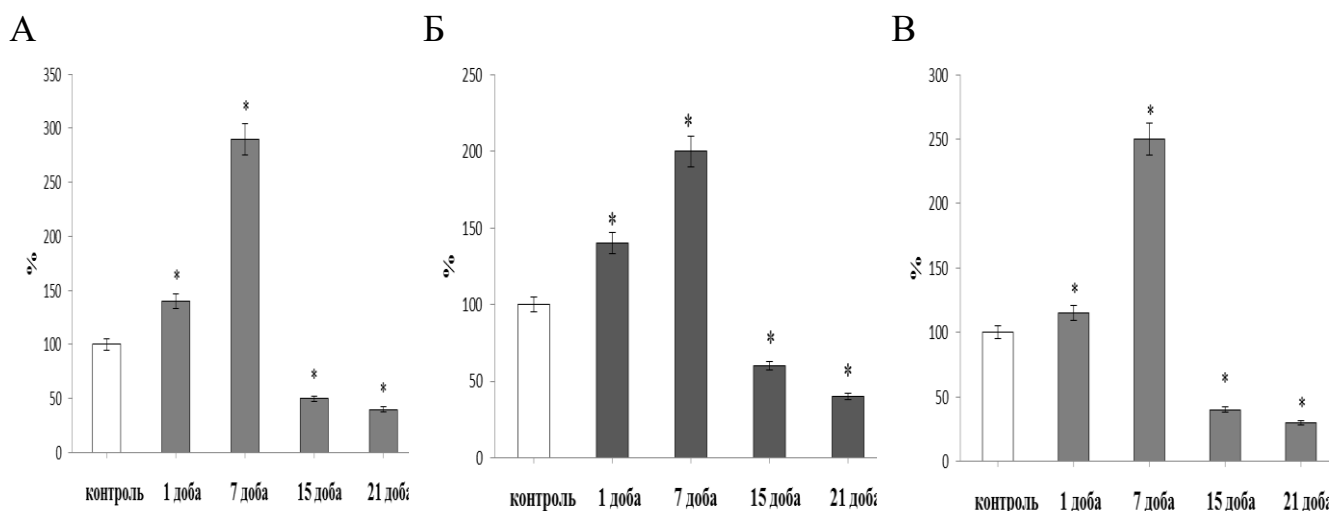


Рис. 3. Активність: загальна протеолітична (А), серинових протеїназ (Б), металопротеїназ (В) у плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

На 15 та 21 добу активність металопротеїназ знизилась у 2,3 та 3,4 раза, відповідно відносно контрольних показників. Подібна тенденція спостерігалась при визначенні активності серинових протеїназ. Даний показник підвищувався на 7 добу після опіку в 2 рази відносно контролю. На 15 та 21 добу спостерігали зниження активності ферменту в 1,5 та 2,5 рази відповідно.

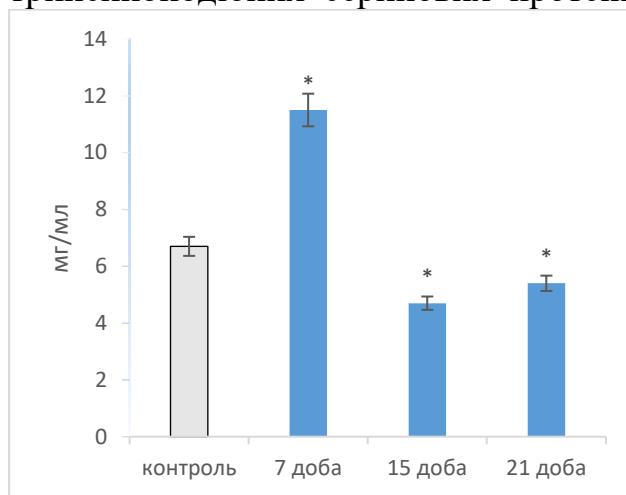
Отже, КОС супроводжується зниженням у плазмі крові загальної протеолітичної активності, у тому числі активності металопротеїназ та серинових протеїназ на 21 добу після травми. Варто зазначити, що процеси регенерації за опіку стравоходу починаються з 10 – 15 доби, тому зниження активності основних протеолітичних ферментів, які беруть участь у ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), може призвести до надмірного рубцювання опікової рани [Bergin D., et al, 2012].

Показано, що за ХОС відбуваються зміни в протеолітичному профілі, спостерігається підвищення протеолітичної активності та активності серинових протеїназ і металопротеїназ у плазмі крові. Підвищується активність  $\alpha 2$ -кроблобуліну та  $\alpha 1$ -антитрипсину. Підвищується вміст ММП за умов зниження вмісту ТІМП-1. Нами було встановлено підвищення вмісту ММП-2 та ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу, оскільки при пошкодженні тканин ММП потрапляють у кров, то нами було досліджено підвищення вмісту ММП-2 та ММП-9 у кровотоці. Висока активність ММП спричиняє активацію плазіногену та перехід його в плазмін. Унаслідок цього відбувається надмірне зростання активності плазіну та його аутокаталіз.

**Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов хімічного опіку стравоходу.** Реакціям протеолізу належить ключова роль не тільки в регуляції внутрішньоклітинного обміну білків, але й у таких

процесах як їх транслокація всередині й поза клітиною, утворення активних ферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Надмірна активність протеолітичних ферментів обмежується білковими інгібіторами, що формують з ферментами стійкі інактивовані комплекси. Активовані ферменти часто самі виявляються активаторами інших білків, формуючи тим самим складні й багатокомпонентні активаційні каскади, що регулюють найважливіші шляхи метаболізму [Magali de Bruyna B, 2016]. Зрозуміло, що порушення активаторно-інгібіторного балансу будь-якого з компонентів подібних каскадів неминуче позначиться на функціонуванні пов'язаних систем і всього організму в цілому, складаючи молекулярну основу численних патологій [Sarrazy V., 2011].

На першому етапі досліджень було проведено виділення трипсиноподібних серинових протеїназ з плазми крові щурів за умов ЛОС.



Показано, що концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові достовірно збільшувалась за умов ЛОС на 7 добу на 71% та зменшувалась на 15 та 21 добу на 30% та 19%, порівняно з контролем (рис. 4)

Рис. 4. Концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \*-  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Зростання концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові щурів може бути пов'язано з розвитком оксидативного стресу в результаті опіку стравоходу, що зумовлює пошкодження клітинних мембран і вихід протеаз у кровотік, а також можливим зниженням синтезу інгібіторів протеолізу [Frossing S., 2010].

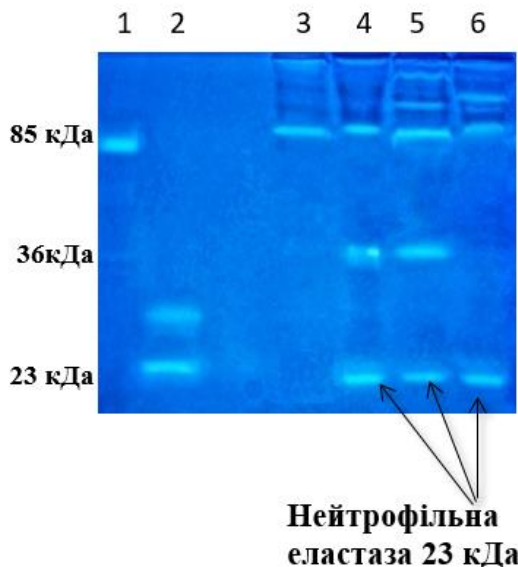


Рис. 5. Ензимограма трипсиноподібних серинових протеаз у плазмі крові за лужного опіку стравоходу; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ );  
1,2-маркери  
3- контроль  
4,5,6 - ЛОС 7, 15, 21 доба

При аналізі ензим-форезу трипсиноподібних серинових протеїназ виявлено значну кількість низькомолекулярних активних протеолітичних ферментів, що утворились унаслідок деградації схильного до автолізу плазміну (рис. 5).

При порівнянні треків плазм щурів з опіками стравоходу і треків контрольних щурів видно, що низькомолекулярні похідні плазміну зустрічаються як за норми, так і за патології, однак ензим-форези в плазмі щурів з опіком істотно відрізняються від норми як за кількісним, так і за якісним вмістом низькомолекулярних похідних плазміну. Це може свідчити про посилення процесів, що можуть провокувати утворення деградованих форм плазміну/плазміногену в кровотоці.

Фракції з М.м. 127, 116, 106, 95 та 90 кДа, можливо, відповідають комплексам трипсиноподібних ферментів плазми крові з іншими білковими молекулами. Фракція з М.м. 85 кДа відповідає плазміну; спостерігається підвищення його активності за ЛОС на 15 добу, що перевищувало контрольні значення на 40%. Фракція з М.м. 36 кДа, можливо, відповідає міні-плазміну, який утворюється в результаті автолізу плазміну. Ця фракція з'являлась за ЛОС, у контрольних пробах її не виявлено. Це може свідчити про надмірну протеолітичну активність плазміну за умов опіку, що призводить до його деградації. Також було показано, що за умов ЛОС відбувається утворення низькомолекулярних фракцій з М.м 74, 54, 43, 36, 23 кДа. Фракція з М.м 23 кДа може відповідати еластазі. Було показано наявність цієї фракції за умов ЛОС на 21 добу.

Також було проведено аналіз ензимограми слизової оболонки стравоходу, що показав наявність білкових фракцій з молекулярними масами 92 та 20 кДа за умов ЛОС (рис. 6).

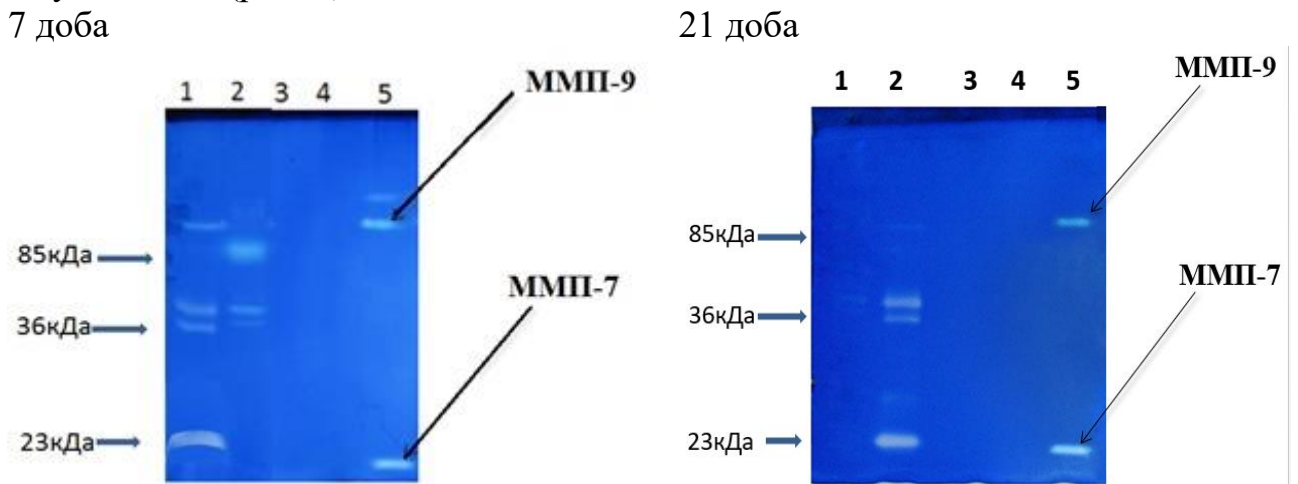


Рис. 6. Ензимограма матричних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ); 1, 2-маркери; 3,4-контроль; 5- ЛОС

Білкова фракція з молекулярною масою (М.м.) 92 кДа, імовірно, відповідає ММП-9, що відноситься до класу желатиназ. ММП-9, або желатиназа В, має високу спорідненість до денатурованого колагену (желатину), але також здатна розщеплювати нативний колаген VI, V і XI типів, еластин. У залежності від місця розщеплення цих молекул ММП-9 може знижувати або підвищувати їх біологічну активність [Ганусевич І.І., 2019]. Було показано, що за умов ЛОС спостерігається наявність фракції, що може

відповідати ММП-9 на всі досліджувані доби експерименту порівняно з контрольними значеннями.

Також на ензімограмі була виявлена фракція з М.м. 20 кДа, що може відповідати ММП-7, яка відноситься до класу матрилізинів. Дана металопротеїназа одна з найменших мелатопротеїназ, що складається з про-домену та каталітичного домену. ММП-7 експресується за нормальних та патологічних умов [Miao S., 2015]. Нещодавні дослідження вказують, що ММП-7 є одним з первинних прогностичних маркерів ракового переродження тканин стравоходу. Були проведені дослідження у яких показано, що при злоякісних переродженнях клітин стравоходу достовірно підвищується експресія та активність ММП-7 [Long Z., 2014; Miao S., 2015; Ганусевич І.І., 2019].

У зв'язку з цим є актуальним дослідження складу білків сироватки крові та слизової оболонки стравоходу за ХОС, оскільки отримані дані дозволять розширити уявлення про метаболічні процеси в організмі, викликані надмірною активацією протеолізу. Аналіз електрофореграми білкового складу сироватки крові в контрольних зразках та пробах, отриманих від тварин з ЛОС, показав наявність фракцій від 15 до 168 кДа. Було показано, що за умов ЛОС спостерігалось зростання фракцій з М.м. 168 та 150 кДа на протязом всього експерименту, особливо високий вміст був на 21 добу, що перевищував контрольні значення в 2 рази для фракції М.м. 168кДа та в 2 рази для фракції з М.м. 150кДа. Фракція з М.м. 67кДа, що, можливо, відповідає альбуміну за ЛОС, вміст якої знижувався на всі досліджувані доби. Так на 7 добу вміст був нижчим за контрольні значення на 54 %. Зниження вмісту альбумінів, можливо, є наслідком підвищення проникності судинної стінки й трансудації їх із кров'яного русла, а також може свідчити про порушення функціонального стану печінки, оскільки саме вона є основним місцем синтезу альбумінів [Melnikova N. M., 2012]. Дослідження вмісту інших фракцій сироватки крові за різних типів опіків показало різнонаправлені значення їх вмісту впродовж всього експерименту. Отже, дослідження електрофореграми сироватки крові щурів за умов ЛОС та КОС виявило достовірні зміни вмісту білкових фракцій порівняно з контрольними значеннями.

Представлені дані показують, що за умов ЛОС відбувається порушення балансу між протеїназами та їх інгібіторами в плазмі крові. Показано зростання протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Виявлено збільшення низькомолекулярних форм плазміну, що може свідчити про надмірну його активацію.

У результаті активації протеолізу в пошкоджених тканинах, а також у плазмі при виході у кров протеолітичних ферментів відбувається накопичення продуктів деградації білків з молекулярною масою 0,3-5 кДа. Показник рівня МСМ є біохімічним маркером, який відображає рівень патологічного білкового метаболізму. МСМ поділяються на дві великі групи: молекули середньої молекулярної маси та олігопептиди [Нетюхайло Л.Г., 2005; Andreichyn S. M., 2012]. 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 й нерегуляторні функції.

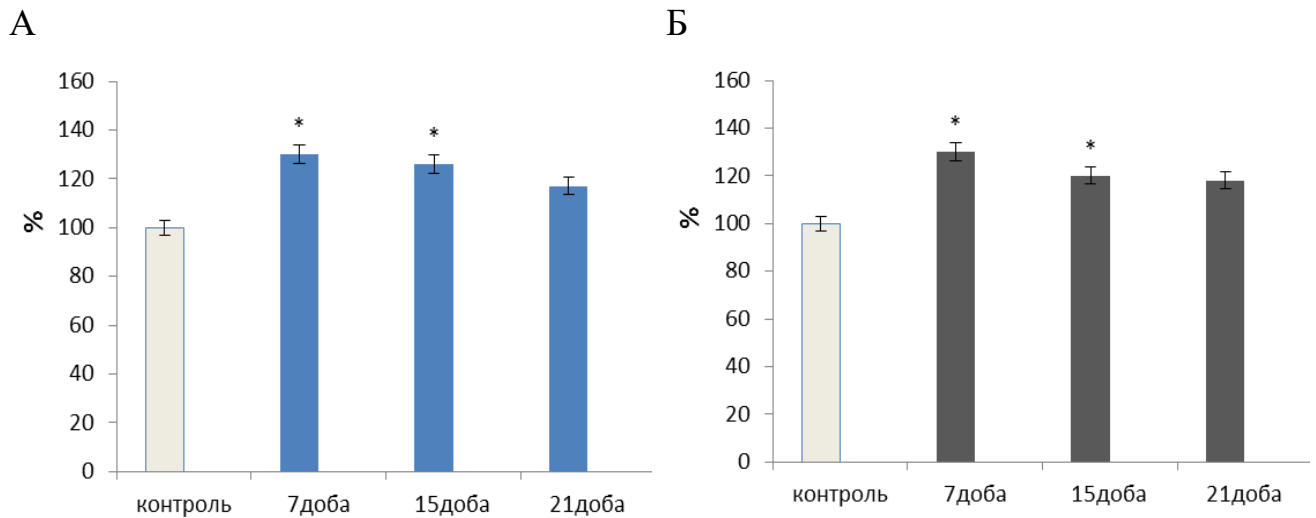


Рис. 7. Вміст молекул середніх мас у сироватці крові (А) та слизовій оболонці стравоходу (Б) щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Нами було визначено вміст МСМ у сироватці крові щурів за умов експериментального моделювання КОС та ЛОС. За умов ЛОС концентрація МСМ зростала в усіх досліджуваних зразках переважно на 7 добу, у сироватці крові на 42%, у слизовій оболонці стравоходу на 28%, порівняно з контрольними значеннями (рис. 7).

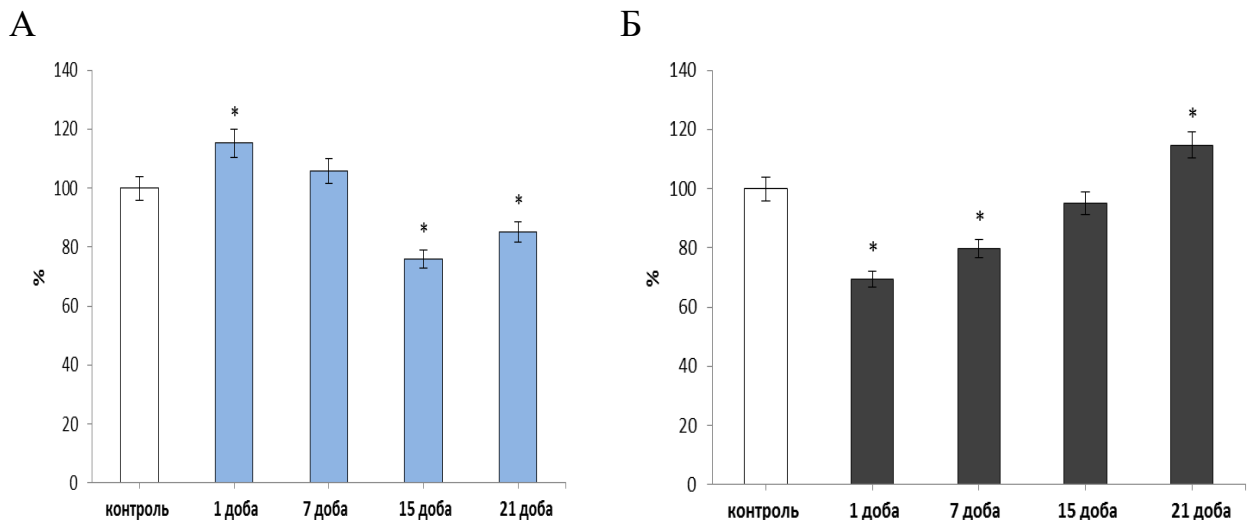


Рис. 8. Вміст молекул середніх мас у сироватці крові (А) та у слизовій оболонці (Б) щурів за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Нами було визначено вміст МСМ у сироватці крові щурів за умов експериментального моделювання КОС (рис.8). На 7 добу експерименту вміст даного показника підвищувався відносно контрольних значень у 1,2 та 1,1 раза,

а на 15 і 21 добу ми спостерігали зниження показника в 1,3 та у 1,2 раза відповідно.

Вміст МСМ у слизовій оболонці стравоходу 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 лишилися нижче контрольного рівня. Максимальне підвищення спостерігали на 21 добу після опіку, у 1,2 раза вище за контроль.

Отримані дані свідчать про підвищення активності протеолітичних процесів та накопичення продуктів деградації, що сприяє гіпоксії, розвитку інтоксикації організму та розладів гемодинаміки веде до порушення функціонування органів і тканин.

У роботі ми визначали вміст IgG у сироватці крові, оскільки вони мають важливе значення в протиінфекційному захисті, забезпечуючи пасивний імунітет у ранньому віці [Nagrel P.C., 1989; Яковлев В.Н., 2017]. Показано, що за умов ЛОС вміст IgG підвищувався на 7, 15 добу, та особливо високими значення були на 21 добу на 51 %, 26,7 % та 126,7 % відповідно, порівняно з контрольними значеннями (рис. 9). Такі високі показники на 21 добу можуть свідчити про хронічний запальний процес за опіку стравоходу. Аналіз проведених досліджень показав, що за КОС відбувалось зниження рівня IgG у 1,5 раза, який є найбільш специфічний ефектором гуморальної ланки, на 1 добу КОС, що відповідає стадії шоку. Зазначені зміни можуть свідчити про те, що в умовах хімічного опіку відбувається зрив адаптаційних реакцій, а також відбувається утворення ЦІК, 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 [Алексеев А.А, 2010; Wu B., 2015].

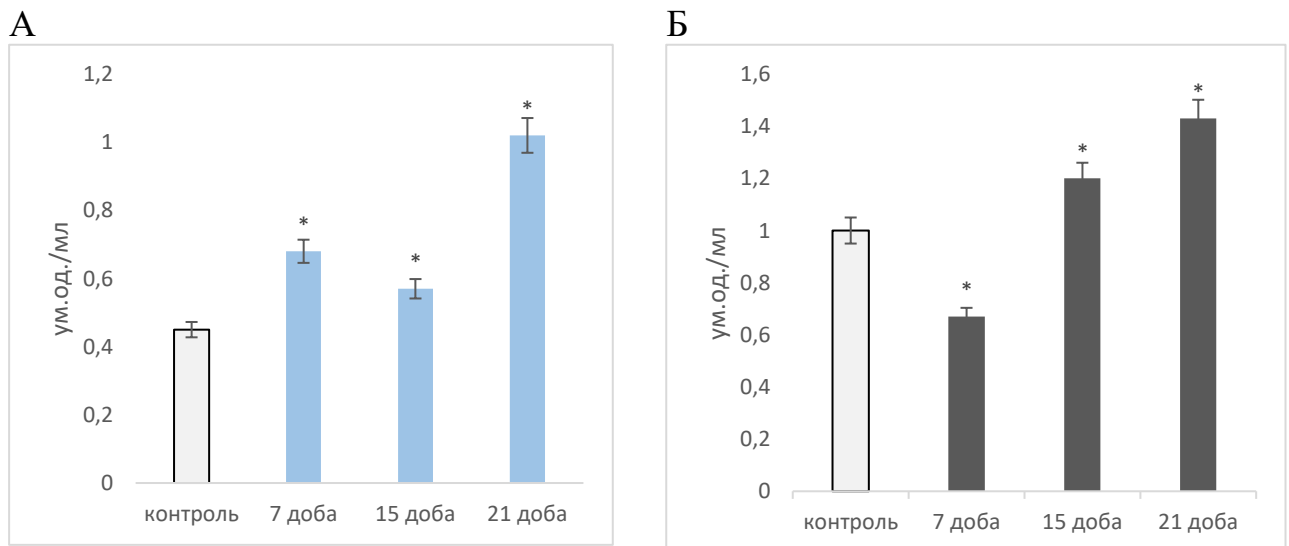


Рис. 9. Вміст IgG у сироватці крові щурів (ум.од./мл) за лужного опіку стравоходу (А) та за кислотного опіку стравоходу (Б) ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Зазначені зміни можуть свідчити про те, що в умовах хімічного опіку відбувається зрив адаптаційних реакцій, а також відбувається утворення ЦІК,

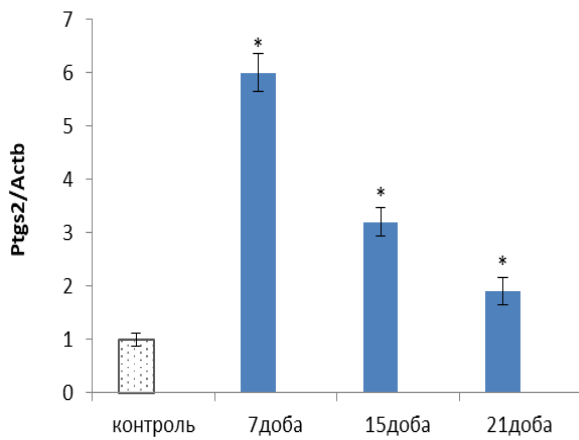
до складу яких входять імуноглобуліни даного класу. Разом з тим, зниження вмісту IgG у крові може бути зумовлено також і зміною кількості В-лімфоцитів та загальних Т-лімфоцитів у периферійній крові [Алексеев А.А, 2010; Wu B., 2015]. Тому такі зміни, на нашу думку, виникли через зниження вмісту загального білка та альбуміну після травми за КОС. Також КОС супроводжувався збільшенням числа лейкоцитів та зменшенням кількості нейтрофілів у даний період часу. Не можна нехтувати впливом і самої кислоти, оскільки відомо, що органічні кислоти у крові частково зв'язуються 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 раза. Згідно з літературними даними, у дітей із хімічними опіками відзначається зниження вмісту IgG у стадії шоку. У стадії токсемії й септикотоксемії вміст IgG зберігає тенденцію до збільшення. Дослідження показників імунітету в постшоковому періоді у хворих на гострі хірургічні інфекційні захворювання продемонструвало зростаючу гіперімуноглобулінемію G аж до 30 діб, а лікування інфекційних ускладнень супроводжувалося повільним зростанням вмісту лімфоцитів і IgG та тривалою гіперімуноглобулінемією M [Алексеев А.А, 2010; Wu B., 2015; Васильев А.Г., 2018], тому підвищення у крові рівня IgG може свідчити про розвиток хронічного інфекційного процесу в організмі.

Отже, опік стравоходу супроводжується змінами в гуморальній ланці імунної системи та появою у кровотоці аутоантіліл, на що вказує підвищення вмісту IgG. Хроматографічним методом нами було отримано фракцію трипсиноподібних серинових протеїназ і було показано, що за умов ХОС зростає їх концентрація в плазмі крові на 7 добу. При аналізі якісного складу трипсиноподібних серинових протеїназ показано утворення деградованих форм плазміну та наявність нейтрофільної еластази. Аналіз відносного вмісту білкових фракцій у сироватці за ЛОС та КОС показав зростання глобулінової фракції та зниження альбумінової. Аналіз білкових фракцій у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС та КОС показав утворення низькомолекулярних фракцій, що свідчить про активацію протеолітичної системи. При визначенні вмісту МСМ у сироватці та слизовій було показано підвищення вмісту переважно на 7 добу досліджень. При аналізі ензімограми у слизовій оболонці стравоходу нами була виявлена фракція, яка може відповідати ММП-7, яка є прогностичним маркером злоякісного переродження тканин стравоходу. Нами було встановлено підвищення вмісту ММП у тканинах і у кровотоці, та як результат утворення нетипових форм білків, таких як продукти деградації білків (деградовані форми плазміну, нейтрофільна еластаза), зміни білкового профілю, МСМ, надмірна експресія ММП-7, аутоімунних антитіл (Ig класу G). Таким чином, порушення процесів протеолізу (та його циклічний характер), а також підвищена концентрація нетипових форм білків негативно впливає на процеси регенерації.

**Процеси загоснення за умов хімічного опіку стравоходу.** Нами було проведено дослідження змін біохімічних показників, стану АОС, дослідження імунної відповіді, які зазнали змін за умов ХОС. Тому наступним етапом

дослідження було підтвердити наявність запального процесу на молекулярному рівні, а також активацію різноманітних молекул на рівні експресії генів (рис. 10, 11)

А



Б

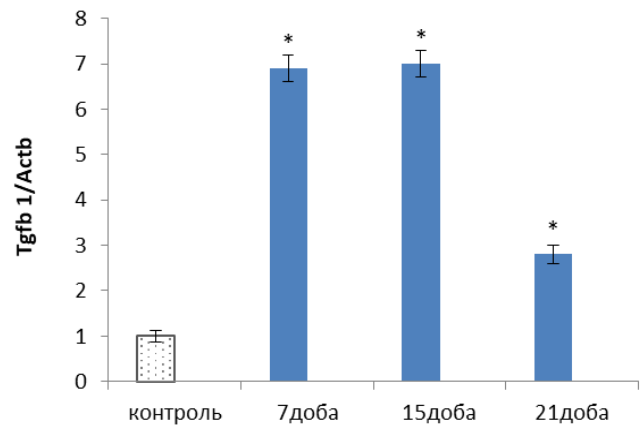
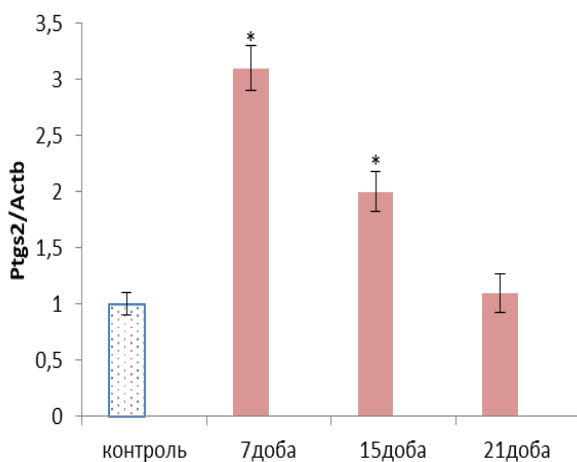


Рис.10. Відносний рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* та *Tgfb1* у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Циклооксигенази/ендопероксид синтази простагландину (Cox / *Ptgs* 1 & 2) генерують простагландини, які відіграють роль у регуляції судинного тонуусу, тромбозу, запалення та болю [Ferrer M., 2018; Pan Y., 2018]. Було визначено рівень експресії генів *Ptgs2* у слизовій оболонці стравоходу та лейкоцитах сироватки крові за умов ЛОС.

Рівень експресії гена *Ptgs2* у слизовій оболонці стравоходу в групі тварин з ЛОС був вищим у 6; 3,2 і 1,6 рази ( $p \leq 0,0001$ ) на 7, 15 і 21 добу загоєння відповідно, у порівнянні з контролем. Рівень експресії гена *Ptgs2* у лейкоцитах крові у групі тварин з ЛОС був вищим у 3,1 і 2,0 рази ( $p \leq 0,0001$ ) на 7 і 15 добу загоєння відповідно, в порівнянні з контролем. На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

А



Б

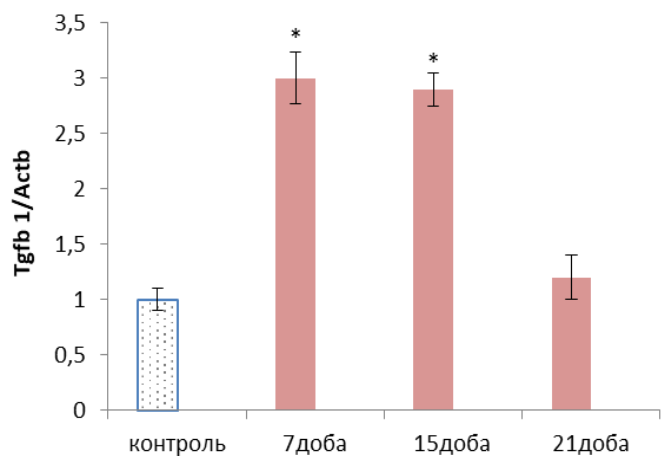


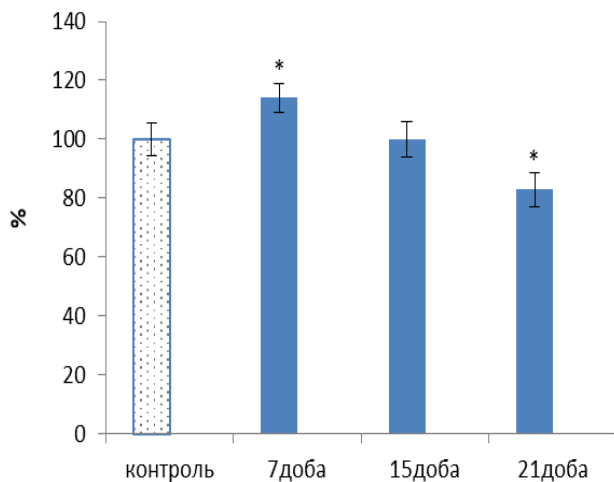
Рис.11. Відносний рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* та *Tgfb1* у крові за умов лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Трансформаційний фактор росту бета (Tgfb) контролює широкий спектр клітинних реакцій, включаючи диференціювання, клітинну проліферацію, міграцію, апоптоз, позаклітинну реконструкцію та розвиток позаклітинного матриксу [Vaugé S., et al, 2011]. Tgfb грає важливу роль у процесі загоєння рани. Безпосередньо після ушкодження він у великій кількості вивільняється з дегранульованих тромбоцитів, виконуючи функцію хемоаттрактанта для лімфоцитів, фібробластів і нейтрофілів.

Рівень експресії гена *Tgfb1* у слизовій оболонці стравоходу в групі тварин з ЛОС був вищим у 6,9; 7 і 2,8 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7, 15 і 21 добу загоєння відповідно, в порівнянні з контролем. Рівень експресії гена *Tgfb1* у лейкоцитах крові в групі тварин з ЛОС був вищим у 3 та 2,9 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7 і 15 добу загоєння відповідно, в порівнянні з контролем. На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

За умов ХОС рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* підвищувався переважно на 7 та 15 добу експерименту як у лейкоцитах крові, так і у слизовій оболонці стравоходу, що вказує на розвиток запального процесу.

ФРФ - це велике сімейство структурно схожих поліпептидів, які стимулюють мітоз багатьох різних типів клітин. ФРФ стимулює поділ фібробластів, судинних ендотеліальних клітин та кератиноцитів *in vitro*, формування нових судин та утворення грануляційної тканини [Christopher Auger, 2017].



Тому доцільним було визначити рівень ФРФ у слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС. Було досліджено, що за ЛОС рівень ФРФ знижувався на 21 добу в 1,2 раза порівняно з контролем (рис. 12).

Рис. 12. Вміст фактору росту фібробластів у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу в групах з ЛОС (рис. 13Б) виявили запальний процес та присутність інфільтрації лейкоцитами, окрім цього відбувалося патологічне приростання серозної оболонки стравоходу до тканин трахеї

На 15 добу за ЛОС (рис. 13В) зафіксували зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації. Також за ЛОС на 21 добу (рис. 13Г) спостерігали хаотичне укладання й збільшення волокон колагену в підслизовій основі стравоходу, що може бути передумовою патологічного процесу загоєння та початковою фазою розвитку фіброзу.

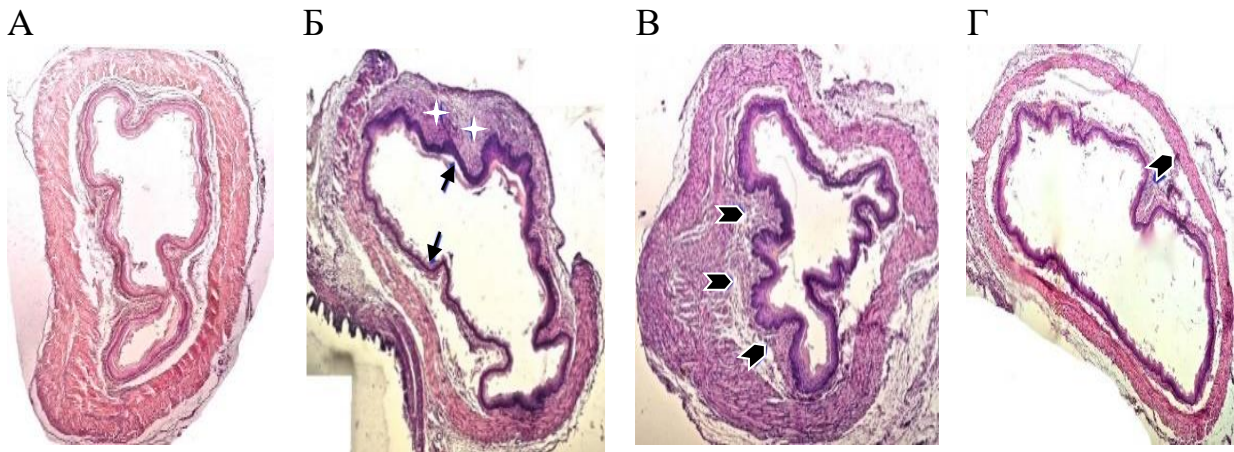


Рис. 13. Мікрофотографії тканин стравоходу контрольних щурів, щурів за лужного опіку стравоходу. Забарвлення гематоксилін-еозином, ок. X 10, об. X 10. А- контроль, Б- ЛОС 7 доба; В – ЛОС 15 доба; Г – ЛОС 21 доба;

Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – порушення епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини

Таким чином аналізуючи регенеративні процеси за умов хімічного опіку стравоходу показано підвищення рівня експресії мРНК генів *Ptgs2* та *Tgfb1*, що свідчить про патологічні процеси загоєння, зниження вмісту фактору росту фібробластів проведені гістологічні дослідження вказують, що за умов хімічного опіку стравоходу присутня залишкова інфільтрація лейкоцитами та надмірне утворення сполучної тканини

**Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов опіку стравоходу та за введення меланіну.** На першому етапі досліджень було проведено виділення трипсиноподібних серинових протеїназ з плазми крові щурів за умов ЛОС та за умов введення меланіну. Показано, що концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові достовірно збільшувалась за умов ЛОС на 7 добу на 71% та зменшувалась на 15 та 21 добу на 30% та 19%, порівняно з контролем (табл. 8).

Таблиця 8

**Концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ (мг/мл) у крові за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

Умови дослідю	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС	6,7±0,2	11,5±0,9*	4,7±0,3*	5,4±0,5*
ЛОС + меланін	6,7±0,2	7,6±0,4*#	4,2±0,4*	4,9±0,3*

\*-  $p < 0,05$  порівняно до контролю; #-  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС

За умов введення меланіну за ЛОС концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ була нижчою на 7 добу на 34%, порівняно з групою тварин лише з ЛОС. Зростання концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові щурів може бути пов'язано з розвитком оксидативного стресу в

результаті опіку стравоходу, що зумовлює пошкодження клітинних мембран і вихід протеаз у кровотік, а також можливим зниженням синтезу інгібіторів протеолізу [Gulyai I.E., 2003]. Меланін як антиоксидант може знижувати активність перекисних процесів в організмі і тому, здатен знижувати концентрацію трипсиноподібних серинових протеїназ.

Доцільно було визначити вміст показників, які з'являються в надмірних кількостях при синдромі ендогенної інтоксикації у крові та слизовій оболонці стравоходу та печінки, що може виникнути внаслідок опіку стравоходу та оцінити яким чином меланін впливає на показники ендогенної інтоксикації за умов ЛОС. За умов ЛОС концентрація МСМ зростала в усіх досліджуваних зразках. Встановлено, що за введення меланіну відбувалося зниження концентрації МСМ на 7 добу у сироватці крові на 51% та у слизовій оболонці стравоходу на 7%, порівняно з показниками за ЛОС (табл. 9).

Таблиця 9

**Вміст молекул середніх мас у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
МСМ (ум.од./мл)	ЛОС	0,42±0,01	0,61±0,01*	0,49±0,01*	0,42±0,01
	ЛОС+меланін	0,42±0,01	0,48±0,01*#	0,41±0,02#	0,44±0,02
Слизова оболонка стравоходу					
МСМ (ум.од./мг білка)	ЛОС	0,145±0,01	0,186±0,01*	0,173±0,01*	0,159±0,01
	ЛОС+меланін	0,145±0,01	0,168±0,01*	0,164±0,01*	0,151±0,01

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

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

Також було проведено аналіз ензімограми слизової оболонки стравоходу, що показав наявність білкових фракцій з М.м. 92 та 20 кДа за умов ЛОС та за умов застосуванні меланіну (рис.14).

Було показано, що за умов ЛОС спостерігається наявність фракції, що може відповідати ММП-9, за введення меланіну активність ММП-9 знижувалась. Активність ММП-7 за ЛОС була висока на 7 та 21 добу експерименту, за умов введення меланіну активність ММП-7 була нижчою порівняно з результатами за опіку

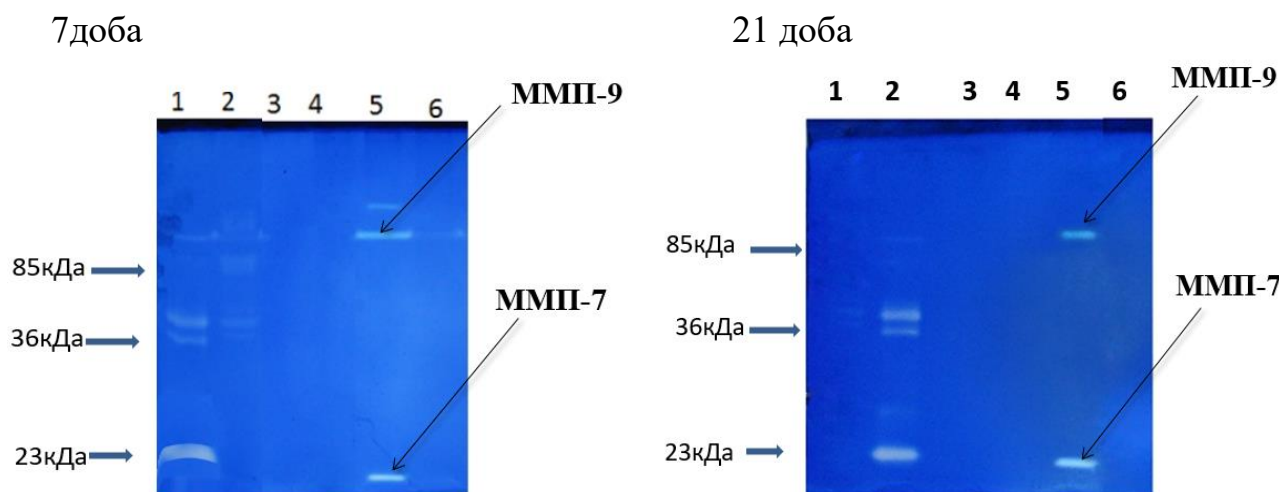


Рис. 14. Ензимограма матричних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу та за застосування меланіну  
1, 2-маркери; 3,4-контроль; 5- ЛОС 7/21доба; 6- ЛОС 7/21доба + меланін

Доцільним було визначити вміст IgG у сироватці крові. Було показано, що за умов ЛОС вміст IgG підвищувався порівняно з контрольними значеннями. Такі високі показники на 21 добу можуть свідчити про хронічний запальний процес за опіку стравоходу. За умов введення меланіну відзначено зниження вмісту IgG у сироватці крові на 7 та 21 добу, порівняно з показниками у тварин з ЛОС: на 7 добу на 23%, на 21 добу на 44% (табл.10).

Такі високі показники на 21 добу можуть свідчити про хронічний запальний процес за опіку стравоходу. За умов введення меланіну відзначено зниження вмісту IgG у сироватці крові на 7 та 21 добу, порівняно з показниками у тварин з ЛОС: на 7 добу на 23%, на 21 добу на 44% (табл.10).

Таблиця 10

**Вміст IgG (ум.од/мл) у сироватці крові щурів за умов хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

Умови дослідю	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС	0,45±0,03	0,68±0,08*	0,57±0,05*	1,02±0,06*
ЛОС + меланін	0,45±0,03	0,52±0,04#	0,55±0,05	0,57±0,04*#

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

Розвиток ЛОС характеризувався тривалим підвищенням IgG, що може вказувати на розвиток запального процесу. Було встановлено, що за умов використання меланіну зниження вмісту IgG у сироватці крові порівняно з показниками у тварин з ЛОС, що сприяє прискоренню процесів загоєння опікової рани.

Отже, представлені дані показують, що за умов ЛОС відбувається порушення балансу між протеїназами та їх інгібіторами в плазмі крові. Показано зростання протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Виявлено збільшення низькомолекулярних форм плазміну, що може свідчити про надмірну його активацію. Меланін знижував активність протеїназ та їх інгібіторів. Аналіз молекулярних механізмів регуляції протеолітичних систем організму за умов опіку стравоходу дозволить більш точно оцінювати ступінь опіку, можливі ускладнення та проводити більш точний моніторинг перебігу хвороби та ефективності лікування. При аналізі якісного складу серинових ферментів за ЛОС та меланіну ми спостерігали відсутність деградованих форм плазміну та нейтрофільної еластази, що може свідчити про позитивний вплив речовини за умов ЛОС. Нами був проведений аналіз білкових фракцій за умов ЛОС за введення меланіну. Було показано зниження глобулінової фракції та зростання альбумінової. При визначенні вмісту МСМ у сироватці та слизовій за ЛОС та за введення меланіну було показано зниження вмісту МСМ порівняно з опіком, при аналізі ензимограми у слизовій оболонці стравоходу нами не була виявлена фракція, яка може відповідати ММП-7. Нами був визначений вміст фракції IgG у сироватці за ЛОС при введенні меланіну та було показано її зниження порівняно з ЛОС. При застосуванні меланіну за умов опіку стравоходу не спостерігається утворення нетипових білкових фракцій, що може свідчити про нормалізацію протеолітичних процесів та первинних ланок ураження.

**Процеси загоєння за умов хімічного опіку стравоходу за введення меланіну.** При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу в групах з ЛОС за введення меланіну (рис. 15А) було помітне зниження інфільтрації лейкоцитами, всіх 3-х оболонок стравоходу, як наслідок - нижчий рівень запалення порівняно з показниками у тварин з ЛОС (рис.13Б).

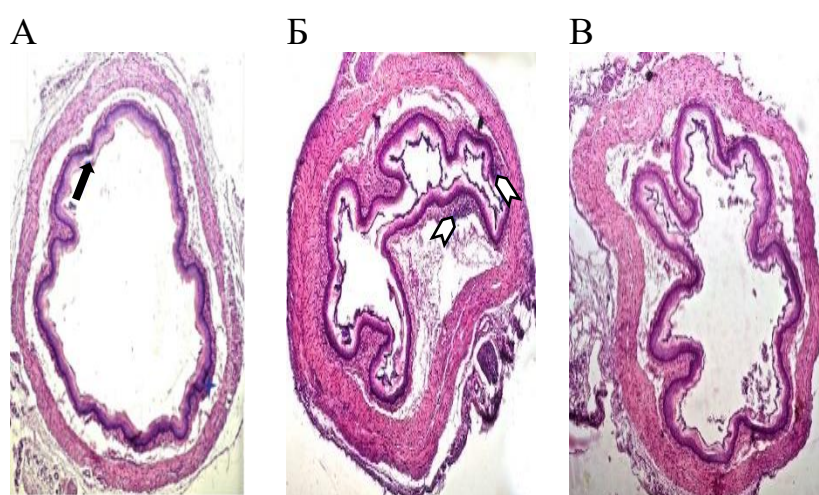


Рис.15. Мікрофотографії тканин стравоходу контрольних щурів, щурів з лужним опіком стравоходу та за умов застосування меланіну. Забарвлення гематоксилін-еозином, ок. X 10, об. X 10. А – ЛОС 7 доба + меланін; Б – ЛОС 15 доба + меланін; В – ЛОС 21 доба + меланін.

Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – порушення епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини

На 15 добу у тварин з ЛОС за умов введення меланіну (рис. 15Б) присутність лейкоцитів повністю знівельована, порівняно з ЛОС (рис. 13В). На 21 добу досліджень за ЛОС за умов застосування меланіну (рис. 15В) відбувалося майже повне відновлення уражених тканин з незначним розростанням сполучної тканини в підслизовій основі. Таким чином, у групах з ЛОС при застосуванні меланіну спостерігали відновлення тканин з невеликим розростанням сполучної тканини в підслизовій основі.

Було визначено рівень ФРФ у слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС та при застосуванні меланіну. За ЛОС рівень ФРФ знижувався на 21 добу в 1,2 раза, порівняно з контролем. За введення меланіну на 21 добу рівень ФРФ підвищувався в 1,2 раза порівняно з показниками за ЛОС та наближався до контрольних значень (табл. 11).

Таблиця 11

**Вміст фактору росту фібробластів (ум.од/мг білка) у слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС	14,1±0,9	16,1±0,6*	14,1±1,3	11,7±0,9
ЛОС + меланін	14,1±0,9	14,5±0,8#	12,7±0,9	14±1,0#

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

Таким чином, представлені дані показують, що за умов ХОС відбувається порушення балансу між протеїназами та їх інгібіторами. Показано зростання протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Виявлено наявність низькомолекулярних форм плазміну, що може свідчити про надмірну його активацію. Аналіз молекулярних механізмів регуляції протеолітичних систем організму за умов опіку стравоходу, дозволить більш точно оцінювати ступінь опіку, можливі ускладнення та проводити більш точний моніторинг перебігу хвороби та ефективності лікування. При аналізі якісного складу трипсиноподібних серинових протеїназ за введення меланіну за ХОС ми спостерігали відсутність деградованих форм плазміну та нейтрофільної еластази. Аналізуючи якісний та кількісний склад білкових фракцій було показано зниження глобулінової та зростання альбумінової фракцій. Визначення вмісту МСМ за введення меланіну за ХОС було показано зниження цього показника порівняно з опіком. При аналізі ензімограми слизової оболонки стравоходу за ХОС та за введення меланіну нами не була виявлена фракція, яка може відповідати ММП-7. За введення меланіну було показано зниження вмісту IgG порівняно з даними за ХОС. При застосуванні меланіну за умов ХОС не спостерігається утворення нетипових білкових фракцій, що може свідчити про нормалізацію протеолітичних процесів та первинних ланок ураження.

## ВИСНОВКИ

Результати, представлені у дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди на біохімічні процеси, що пов'язані з функціонуванням системи протеолізу за хімічних опіків стравоходу, та висвітлюють перспективний напрямок майбутніх досліджень, а саме, ідентифікацію в кровотоці білкових молекул, що здатні деталізувати процеси загоєння опіків стравоходу та можуть бути використанні в якості діагностичних та прогностичних маркерів розвитку та протікання цього патологічного процесу.

1. Встановлені особливості зрушень основних метаболічних процесів в організмі щурів за умов кислотного та лужного опіку слизової оболонки стравоходу.

2. Встановлено підвищення рівня прозапальних цитокінів після опіку на тлі дефіциту протизапальних цитокінів, що супроводжувалося підвищенням концентрації IgG та вмісту середньо- й низькомолекулярних ЦК. Такі зміни цитокінового профілю співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани.

3. Виявлено порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, а саме: підвищення рівня продуктів окиснення ліпідів і білків та дисрегуляція антиоксидантних ферментних систем, що призводить до зміни активності протеїназ та їх інгібіторів за дії хімічних опіків стравоходу.

4. Показано, що за хімічного опіку стравоходу виявлено зміни в протеолітичному профілі сироватки крові, а також відбуваються кількісні зміни вмісту білкових фракцій. Помічено зменшення вмісту альбумінової фракції, зростання вмісту глобулінової фракції відносно контролю. Встановлено, що відбувалось підвищення рівня  $\alpha 2$ -макроглобуліну та активності серинових та металопротеїназ у плазмі крові.

5. Доведено, що за опіку стравоходу відбувається протеолітична деградація білків тканини стравоходу. При цьому спостерігаються кількісні зміни вмісту білкових фракцій, показано підвищення вмісту ТІМП-1, фактора росту фібробластів, МСМ та всіх досліджуваних ММП, що може сприяти накопиченню білків міжклітинного матриксу та свідчить про дисбаланс у системі протеолізу.

6. Показано позитивний вплив меланіну на ключові ланки біохімічних процесів, запальний процес та окисно-антиоксидантну рівновагу за хімічного опіку стравоходу.

7. Доведено коригуючий вплив меланіну на баланс між протеїназами та їх інгібіторами в досліджуваних тканинах, що сприяє нормалізації метаболічних функцій та регенеративних процесів в організмі щурів, які зазнали хімічного опіку стравоходу.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Статті в наукових фахових виданнях*

1. Раєцька Я. Б., Іщук Т. В., Савчук О. М., Остапченко Л. І. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу I ступеня в щурів.

Медична хімія. 2013; 15(4): 30-34. (*Особистий внесок: розробка схеми експерименту та моделі, визначення біохімічних показників, написання статті*).

2. **Раєцька Я.Б.**, Іщук Т.В., Джус О.І., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Експериментальна модель лужного опіку I та II-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2014; 6(1): 39 – 44. (*Особистий внесок: розробка схеми експерименту, моделювання опіку, підготовка препаратів, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті*).

3. **Раєцька Я.Б.**, Іщук Т.В., Галенова Т.І., Джус О.І., Остапченко Л.І. Динаміка вмісту молекул середньої маси в плазмі крові щурів при експериментальній опіковій хворобі. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2015; 68: 19-23 (*Особистий внесок: розробка схеми експерименту, моделювання опіку, аналіз отриманих даних, написання статті*).

4. Іщук Т.В., **Раєцька Я.Б.** Савчук О.М. Зміни білкового складу гомогенату стравоходу за розвитку експериментального опіку стравоходу щурів. Молодий вчений. 2015; 4 (19): 162-164. (*Особистий внесок: планування досліджень, отримання матеріалу, аналіз та обробка отриманих результатів, написання статті – спільно, підготовка до публікації*).

5. **Раєцька Я.Б.**, Іщук Т.В., Коваль Т.В., Джус О.І., Савчук О.М. Експериментальне відтворення моделі кислотного опіку стравоходу II-го ступеню. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 19 2(19): 15-19. (*Особистий внесок: розробка схеми експерименту, моделювання опіку, отримання та фіксування зрізів, аналіз даних, написання статті*).

6. Коваль Т.В., Іщук Т.В., **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М., Остапченко Л.І. Вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові та тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2015; 7(3): 15-17. (*Особистий внесок: планування експерименту, дослідження вмісту МСМ, отримання даних та аналіз, участь у підготовці та написанні статті*).

7. **Раєцька Я.Б.** Рівень прозапальних та протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов моделювання лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступеня. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 2015; 2(70): 67 -70.

8. **Раєцька Я.Б.** Показники ендогенної інтоксикації при експериментальній опіковій хворобі в стадії токсемії. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія Біологічні системи. 2016; 8(1): 24-27

9. Коваль Т. В., Рослова Н.М., **Раєцька Я. Б.** Біохімічні та загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу II ступеня. Вісник Львівського університету. Серія: Біологічна. 2016; 73: 298-302. (*Особистий внесок: планування експерименту,*

удосконалення методики, написанні статті, підготовка до публікації – спільно).

10. 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): 52-55. *(Особистий внесок: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, визначення вмісту цитокінів, участь у написанні статті).*

11. Ishchuk T.V., Koval T.V., Savchuk O.M., **Raetska Ya.B.**, Ostapchenko L.I. Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats. Int J Health Sci Res. 2016; 6(12): 259-264. *(Особистий внесок: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, визначення вмісту ММП, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

12. Чорненька Н.М, **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М., Остапченко Л.І. Біохімічні зміни в сироватці крові щурів за умов експериментальної опікової хвороби та їх корекція меланіном. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 44-48 *(Особистий внесок: планування схеми експериментів, визначення показників азотистого обміну, узагальнення результатів, участь у підготовці статті до друку).*

13. Коваль Т.В., Ішук Т.В., **Раєцька Я.Б.** Зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу за розвитку кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017; 1(2): 36-39 *(Особистий внесок: створення схеми експерименту, проведення електрофоретичного розділення білків, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

14. Chornenka N., Valetska K., **Rayetska Ya.**, Ostapchenko L.. Correction of melanin proteolytic activity in the conditions of modeling alkali burns of the esophagus. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation. 2017; 23(2): 53-57. *(Особистий внесок: створення схеми експериментів, визначення якісного складу трипсино-подібних серинових протеїназ, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

15. Дмитрик В.В., **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М., Остапченко Л.І. Біохімічні показники сироватки крові щурів при лужному опіку стравоходу II ступеня за умов введення водного розчину сухого екстракту лушпиння Р. Vulgaris Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2017; 1(22): 36-39. *(Особистий внесок: створення моделі дослідження, визначення біохімічних показників у сироватці крові, аналіз даних, написання статті).*

16. Ішук Т.В., Савчук О.М., **Раєцька Я.Б.**, Верещака В.В., Остапченко Л.І. Функціонування протеїназ в слизовій оболонці стравоходу після хімічних опіків стравоходу. Фізіол. журн. 2015; 61(5): 71-75. *(Особистий внесок: визначення ММП, аналіз результатів, підготовка до публікації).*

17. Ishchuk T.V., Kravchenko N.K., **Raetska Ya.B.**, Ostapchenko L.I. Features of humoral immunity upon chemical burns of esophagus in rats. Ukr. Biochem. J. 2015; 87(3): 91-97. (*Особистий внесок: визначення ЦІК, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті – спільно*).

18. Chornenka N.M., **Raetska YB.**, Savchuk O.M., Torgalo E.O., Beregova T.V., Ostapchenko L.I. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5): 1042-1047. (*Особистий внесок: розробка моделі дослідження, створення схеми експериментів, визначення цитокінового профілю, узагальнення результатів, участь у написанні статті*).

19. Chornenka N.M., **Raetska YB.**, Savchuk O.M., Kompanets I.V., Beregova T.V., Ostapchenko L.I. Effect of different doses of melanin in the blood protein changes in rats under alkaline esophageal burns. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2017; 8(1): 261-270. (*Особистий внесок: моделювання опіку, визначення прозапальних цитокінів, аналіз результатів, підготовка до публікації*).

20. Ishchuk T.V., **Raetska Ya.B.**, Savchuk O.M., Ostapchenko L.I. Changes in blood protein composition under experimental chemical burns of esophageal development in rats. Biomedical Research and Therapy. 2015; 2(4): 241-249. (*Особистий внесок: аналіз літературних джерел, визначення загальної протеолітичної активності, написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).

21. **Raetska Ya. B.**, Chornenka N. M., Koval T. V., Savchuk O. M., Beregova T. V., Ostapchenko L. I. 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. (*Особистий внесок: планування досліджень, визначення цитокінового профілю, вмісту, імуноглобулінів, аналіз та обробка отриманих результатів, написання статті – спільно*).

22. Chornenka N., **Raetska Ya.**, Grebinyk D., Dranitsina A., Savchuk O., Beregova T., Ostapchenko L. Protective antioxidant effect of melanin against chemical burn-induced esophageal injury Biomedical Research and Therapy. 2018; 5(10): 2712-2718 (*Особистий внесок: визначала активність антиоксидантних ферментів, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті – спільно*).

23. Koval T.V., Ishchuk T.V., Grebinyk D.M., **Raetska Ya B.**, Sokur O.V., Savchuk O.M., Ostapchenko L.I. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn. Biomedical Research. 2018; 29 (16): 3169-3173. (*Особистий внесок: аналіз літературних джерел, визначення металоматричних протеїназ, написання та оформлення статті виконано у співавторстві*).

24. **Раєцька Я.Б.**, Дмитрик В.В., Остапченко Л.І. Окремі біохімічні показники сироватки крові щурів за умов хімічного опіку стравоходу. Міжнародна науково-практична конференція Одеса, 2012 р. - С. 24-26.

25. Дмитрик В.В., Іщук Т.В., **Раєцька Я.Б.**, Остапченко Л.І. Вміст креатиніну у сироватці крові щурів за умов хімічного опіку стравоходу. VII

Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 20-23 листопада Харків. 2012 р. - С. 38-39.

26. Іщук Т.В., Дмитрик В.В. **Раєцька Я.Б.** Динаміка активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів при моделюванні хімічного опіку стравоходу. *IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології»*, 16-19 квітня Львів, 2013 р. - С. 56.

27. Дмитрик В.В. Іщук Т.В., **Раєцька Я.Б.** Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу I ступеня в щурів. *VIII Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: Від молекули до біосфери»* 3-6 грудня Харків, 2013р. - С. 59.

28. Ishchuk T.V., **Y. Raetska**, Ostapchenko L.I. Biochemical and immunological blood parameters in dynamics under oesophageal alkali burn model of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degrees. *38<sup>th</sup> FEBS Congress*, July 6-11 Saint Petersburg, 2013. – P. 292.

29. Валецька К.І., Іщук Т.В. **Раєцька Я.Б.** Вміст молекул середніх мас у крові та органах щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу II ступеню. *IX Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери»*, 18-20 листопада Харків, 2014 р. - С. 31.

30. Valecka K.I., Ishchuk T.V., **Raetska Y.B.** Experimental modeling of second-degree chemically-induced esophageal burns in rat. *XII International Scientific Conference of Student and Young Scientist. Shevchenkivska vesna: life sciences*, March 25-28 Kyiv, 2014 р. – С. 67-68.

31. Поталіцин П., Іщук Т., **Раєцька Я.** Визначення біохімічних показників сироватки крові статевонезрілих щурів при моделюванні оцтового опіку 2-го ступеня. *Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології»*, 8-11 квітня Львів, 2014 р. - С.38-39.

32. Іщук Т.В., **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М., Остапченко Л.І. Зміни рівня ендогенної інтоксикації в організмі щурів при хімічному опіку стравоходу 1 ступеня. *The Ukrainian biochemical Journal*. 2014; 86(5): 77.

33. Іщук Т.В., **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М. Молекули середньої маси, як діагностично-прогностичний критерій порушення функціонування ЦНС при експериментальній опіковій хворобі. *VI Конгрес Українського товариства нейронаук*. 4-8 червня Київ, 2014 р. – С. 22.

34. **Raetska Ya**, Ishchuk T., Dzhus O., Savchuk O., Ostapchenko L., Biochemical and immunological blood parameters in dynamic sunderesophageal acid burn model of 2nd degree. *FEBS EMBO.*, August September, Paris, France, 2014. –P. 619.

35. Чорненька Н.М, Іщук Т.В, **Раєцька Я.Б.** Корекція показників ендогенної інтоксикації при експериментальній опіковій хворобі в стадії токсемії *X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: Від молекули до біосфери»* 2-4 грудня Харків, 2015р. - С. 21-22.

36. Ishchuk T., **Raetska Y.**, Savchuk O., Ostapchenko L.. Levels of MMPs and TIMP-1 in esophageal tissue after burn injury. *Abstract of 40th FEBS Congress*, 4-9 July, Berlin, Germany 2015, P. – 136.

37. Іщук Т.В., Коваль Т. В., **Раєцька Я.Б.** Особливості імунної відповіді за умов експериментальної моделі кислотного опіку стравоходу у статевонезрілих щурів. *XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, 19-21 квітня Львів, 2016. – С. 36-37.

38. Пятківська Н., Чорненька Н.М, Іщук Т.В, **Раєцька Я.Б.** Корекція показників ендогенної інтоксикації при моделюванні лужного опіку стравоходу і ступеня у статевонезрілих щурів. *XII міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, 16-19 квітня Львів, 2016 р. – С. 50-51.

39. Мунько О.А, Чорненька Н.М, **Раєцька Я.Б.** Рівень цитокінів при опіку стравоходу першого ступеня у щурів за умов введення препарату меланін *Конференція студентів і молодих науковців «Шевченківська Весна»* 6-8 квітня Київ, 2016р. - С. 138-139.

40. Коваль Т. В., Іщук Т. В., **Раєцька Я.Б.** 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 Київ, 2016. – С. 104-105.

41. Valecka K.I., **Raetska Y.B.** Level of proinflammatory cytokines in blood serum of rats under modeling of 1 and 2 degrees alkali burns of the esophagus. 8 *EFIS-EJI South East European Immunology School*, October 14-17 Durres, Albania, 2016 p. – С. 8.

42. Koval T. V., **Raetska Ya. B.**, Savchuk O. M. Experimental model of an acid esophagus burn and its main clinical biochemical parameters. *2nd Prague European Days of Internal Medicine*, December 1–2, Prague, Czech Republic 2016. - P. 73.

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

44. **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М. Рівень цитокінів за умов моделювання лужного опіку стравоходу при введенні антиоксидантного препарату. *IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини»*, ВІМСО, 2017 р. - С. 56.

45. Мунько О.М, Чорненька Н.М., **Раєцька Я.Б.** Вплив меланіну на рівень цитокінів у сироватці крові щурів за опіку стравоходу першого ступеня *XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів молодь і поступ біології*. 25 – 27 квітня Львів, 2017 р. - С. 40-41.

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

47. Чорненька Н.М, **Раєцька Я.Б.**, Савчук О.М. Рівень матриксних металопротеїназ у сироватці крові щурів при лужному опіку стравоходу за умов

введення меланіну *XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів молоді і поступ біології* Львів, 25 – 27 квітня 2017р. - С. 59.

48. Лисенко В. С., Дмитрик В. В., **Раєцька Я. Б.** Вплив водного екстракту стручків *Phaseolus Vulgaris* на запальний процес внаслідок лужного опіку стравоходу *II ступеня. «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScienceAdvances»*. 18–21 квітня Київ, .2017 р. - С. 58.

49. Chornenka NM, **Raetska YA**, B, Savchuk OM. Dynamics Change of Proteolytic Activity under Experimental Burns of the Esophagus and Correction of Melanin *PHOENIX 2017*, the second edition of our International Medical Students' Conference 22-26 March, 2017. - P. 197.

50. Тунчик Ю.О., Коваль Т.В., **Раєцька Я.Б.** 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 Київ, 2017. - С. 78-79.

51. Pasichnyk L.V., Dmytryk V.V., **Rayetska Ya.B.**. The effect of aqueous extract of *Phaseolus Vulgaris* pods on the some biochemical parameters in the conditions of esophagus burn of second degree in rats. *«Youth and Progress of Biology»*. 25-27 April, Lviv, 2017. - P. 43.

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

53. Chornenka NM, **Raetska Ya.B**, Savchuk OM. Molecular markers of effective healing process under chemical burn of the esophagus in use of melanin. *15th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry* 10-13 September Germany 2018. - P. 115.

54. Ivashko, L., Dmytryk, V., **Raetska, Y.** Biochemical parameters of the rats with esophageus burn treated with aquesous extract of phaseolus vulgaris pods. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine* (collection of Abstracts) The Czech Republic, 2(1), 2018. – P. 14-16.

55. **Raetska Ya. B**, Savchuk OM. Proteasomes activity in the rat's esophagus under. Acid burns of II stage *15th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry*, 10-13 September Germany, 2018. – P. 112.

## АНОТАЦІЯ

**Раєцька Я.Б. Біохімічні механізми за хімічного опіку стравоходу -**  
Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2019.

Дисертація присвячена з'ясуванню ролі процесів протеолізу в молекулярно-біохімічних механізмах ушкодження та регенерації слизової оболонки стравоходу за умов хімічного опіку.

Результати поглиблюють існуючі погляди на функціонування біохімічних механізмів за ХОС. Виявлені суттєві порушення в імунній ланці – підвищення прозапальних цитокінів на тлі дефіциту протизапальних, окисно-антиоксидантної рівноваги – активація процесів ПОЛ та дисрегуляція антиоксидантних ферментних систем. Показано зміни в протеолітичному балансі, підвищення активності протеолітичних ферментів та їх інгібіторів у крові та тканинах за ХОС. Вперше ідентифіковано в кровотоці білкові молекули, що дають змогу деталізувати процеси загоєння ХОС та можуть бути використанні в якості діагностичних та прогностичних маркерів розвитку та перебігу цього патологічного процесу. Розроблено концептуальну схему щодо встановлення основних біохімічних механізмів за ХОС та запропоновано засоби корекції, які можуть бути ефективними при лікуванні післяопікових ускладнень.

**Ключові слова:** хімічний опік стравоходу, імунні процеси, антиоксидантні процеси, протеоліз, меланін.

## АННОТАЦІЯ

**Раецкая Я.Б. Биохимические механизмы при химическом ожоге пищевода - Рукопись.**

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

Диссертация посвящена выяснению роли процессов протеолиза в молекулярно-биохимических механизмах повреждения и регенерации слизистой оболочки пищевода в условиях химического ожога.

Результаты углубляют существующие взгляды на функционирование биохимических механизмов при ХОП. Выявлены существенные нарушения в иммунном ответе - повышение провоспалительных цитокинов на фоне дефицита противовоспалительных, окислительно-антиоксидантного равновесия - активация процессов ПОЛ и дисрегуляция антиоксидантных ферментных систем. Показаны изменения в протеолитическом балансе, повышение активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в крови и тканях при ХОП. Впервые идентифицированы в кровотоке белковые молекулы, которые позволяют детализировать процессы заживления при ХОП и могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических маркеров развития и течения этого патологического процесса. Разработана концептуальная схема по установлению основных биохимических механизмов при ХОП и предложены методы коррекции, которые могут быть эффективными при лечении послеожоговых осложнений.

**Ключевые слова:** химический ожог пищевода, иммунные процессы, антиоксидантные процессы, протеолиз, меланин.

## SUMMARY

### **Raietska Y.B. Biochemical mechanisms chemical burns of the esophagus - Manuscript.**

Dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences in the speciality 03.00.04 - Biochemistry. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to find out the role of proteolysis processes in molecular-biochemical mechanisms of injuries and healing of esophageal mucosa under conditions after chemical burn (ECB).

The results deepen existing views on the functioning of biochemical mechanisms in the development of ECB. An increase of the level of pro-inflammatory cytokines after burns was established against the background of anti-inflammatory cytokine deficiency, which was accompanied by an increase in IgG concentration and the content of medium and low molecular weight circulating immune complexes. Changes in the cytokine profile coincide with the activation of proteolysis and indicate a slowing of wound healing. Significant disturbances of the oxidation-antioxidant equilibrium have been revealed, namely the increase of the level of lipid and protein oxidation products and the dysregulation of antioxidant enzyme systems, which leads to changes in the activity of proteins and their inhibitors under the action of chemical burns of the esophagus. Changes in the proteolytic profile of serum and quantitative changes in the content of protein fractions by ECB were shown. There was a decrease in the content of albumin fraction, an increase in the content of globulin fraction relative to control. The increase of  $\alpha$ 2-macroglobulin level and the activity of serine and metalloproteinases in blood plasma were found. It has been proved that proteolytic degradation of esophageal tissue proteins occurs during esophageal burns, which consists in changing the ratio of quantitative content of protein fractions, an increase of TIMP-1 content, growth factor of fibroblasts, changes in polypeptide pull and all types of matrix metalloproteinases (MMPs), which influences the accumulation of protein malfunctions and malfunctions proteolysis system.

Protein molecules have been identified for the first time in the bloodstream, which makes it possible to detail the processes of ECB healing and can be used as diagnostic and prognostic markers for the development and course of this pathological process.

Melanin reduced the activity of proteinases and their inhibitors. Analysis of the molecular mechanisms of regulation of the proteolytic systems of the body under conditions of ECB will allow a more accurate assessment of the degree of burns, possible complications and to more accurately monitor the course of the disease and the effectiveness of treatment. When analyzing the qualitative composition of serine enzymes under the conditions of ECB and melanin, we observe the absence of previously formed degraded forms of plasmin and neutrophil elastase, which may indicate a positive effect of the substance under the conditions of ECB. We analyzed protein fractions under the conditions of ECB for the introduction of melanin.

A decrease in the globulin fraction and an increase in albumin were shown. When determining the polypeptide pull content in serum and mucosa in VOCs and melanin, a decrease in the polypeptide pull content was observed compared to burns. When analyzing the enzyme in the mucosa of the esophagus with ECB for melanin, we did not find a fraction that can correspond to MMP-7, which may be a prognostic marker of malignant degeneration of the tissues of the esophagus. We determined the serum IgG content, it showed a decrease in IgG compared to ECB. When using melanin under conditions of esophageal burns, the formation of atypical protein fractions is not observed. That may indicate the normalization of proteolytic processes and primary links of the lesion. A conceptual scheme for the establishment of basic biochemical mechanisms for ECB has been developed and remedies that can be effective in the treatment of post-burn complications are proposed.

**Keywords:** esophageal chemical burn, immune processes, antioxidant processes, proteolysis, melanin.