

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**РАЄЦЬКА ЯНА БОРИСІВНА**

УДК: 616.329-001.37-053

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ЗА ХІМІЧНОГО ОПІКУ  
СТРАВОХОДУ**

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ Раєцька Я.Б.

Науковий консультант: **Остапченко Людмила Іванівна** д.б.н., професор

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

**Раєцька Я.Б. Біохімічні механізми за хімічного опіку стравоходу -**  
Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київ, 2019

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я опіки займають третє місце серед інших травм. Актуальність проблеми хімічних опіків стравоходу (ХОС) визначається порівняно високою частотою їх у побуті, тяжкістю опікової травми, складністю і тривалістю лікування таких хворих, частою інвалідизацією та високою летальністю. За видом агента, що викликає ХОС найчастіше розрізняють: лужні та кислотні. Тяжкість ХОС залежить від кількості та концентрації вжитої хімічної речовини. На сьогодні є важливим 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 регенеративних процесів за цих умов.

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

Одним з головних діагностичних критеріїв тяжкості при опіках є визначення біохімічних показників. Вони корелюють з функціональним станом організму та ступенем метаболічних порушень за досліджуваної

патології, які пов'язані з придатністю організму та ступенем досліджуваних порушень обміну речовин. Було визначено основні біохімічні показники в сироватці крові, дослідження проводили за ЛОС та КОС. За умов лужного та кислотного опіку спостерігали зниження концентрації загального білка та альбуміну, зростання сечовини та креатиніну, зміни в йонному обміні, та зростання активності АСТ, АЛТ. 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.

За опіку виділяється велика кількість медіаторів запалення, які активують запальний процес, що сприяє підвищенню вмісту прозапальних цитокінів після опіку на тлі дефіциту протизапальних цитокінів, такі зміни цитокінового профілю співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани. Встановлено підвищення рівня прозапальних цитокінів після опіку на тлі дефіциту протизапальних цитокінів, що супроводжувалося підвищенням вмісту середньо- й низькомолекулярних ЦК. Такі зміни цитокінового профілю, співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани.

За моделювання хімічного опіку відбувалось зростання активності обох ізоформ NOS. Такі зміни негативно впливають на процеси післяопікових загоєнь, оскільки при високій концентрації показника можуть виникає токсичний ефект, пов'язаний з утворенням окиснювач - пероксинітрит (ONOO-). Пероксинітрит негативно впливає на тканини, він змінює структуру мембран, а за синтезу клітин і ДНК здатен змінювати у клітині енергетичний обмін. Таким чином, за опіку стравоходу, спостерігали порушення прооксидант-антиоксидант балансу.

За опіку стравоходу на тлі підвищеної активності процесів ПОЛ (ДК, ТБК-активні продукти) відзначалося значне пригнічення механізмів АОЗ (активність СОД). Виявлені 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 ХОС.

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

Показано, що за ХОС відбуваються зміни в протеолітичному профілі, спостерігається підвищення протеолітичної активності та активності серинових протеїназ та ММП у плазмі крові. Підвищується активність  $\alpha 2$ -МГ та  $\alpha 1$ -АТ. Підвищується вміст ММП на тлі зниження вмісту ТІМП-1. Нами було встановлено підвищення вмісту ММП 2 та ММП 9 у тканинах, 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 плазміногену та перехід його в плазмін. Унаслідок цього відбувається надмірне зростання активності плазміну та його аутокаталіз.

Опік стравоходу супроводжується змінами в гуморальній ланці імунної системи та появою в 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 ензимограми 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 в 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 (IgG). Таким чином, порушення процесів протеолізу (та його циклічний характер), а також підвищена концентрація нетипових форм білків негативно впливає на процеси регенерації.

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

Отже, представлені дані показують, що для опіку стравоходу характерно порушення протеїназно-інгібіторного балансу в плазми крові; зростання активності протеолітичних ферментів та їх інгібіторів. Показано зростання плазмінових форм з низькою молекулярною масою, дані зміни вказують на його надмірну активацію. Досліджено, що за ведення меланіну відбувалось зниження протеїназ-інгібіторної активності. Таким чином, дослідження молекулярних механізмів, які регулюють протеолітичну систему за хімічного опіку дасть можливість більш точно оцінювати ступінь та складність опіку та встановлювати ефективні методи лікування.

При аналізі якісного складу серинових ферментів за умов ЛОС та меланіну ми спостерігаємо відсутність раніше утворених деградованих форм плазміну та нейтрофільної еластази, що може свідчить 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 меланіну було показано зниження вмісту МСМ порівняно з опіком. При аналізі ензімограми у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС за меланіну нами не була виявлена (раніше присутня) фракція, яка може відповідати ММП-7, що може бути прогностичним маркером злякисного переродження тканин стравоходу. Нами був визначений вміст IgG в сироватці. Було показано зниження IgG 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.

Визначений рівень експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* за умов ЛОС та за введення меланіну у крові та слизовій оболонці стравоходу, показано зниження досліджуваних показників протягом всіх термінів порівняно з ЛОС. Визначений відносний вміст фактору росту фібробластів за ЛОС та за введення меланіну, показано зростання вмісту на 21 добу порівняно з ЛОС. При гістохімічному та морфометричному аналізі було оцінено вплив меланіну на дані процеси, показано менш виражене утворення колагенових волокон в ушкоджених тканинах стравоходу, що вказує на протизапальні та антифіброзні властивості цієї речовин. При гістологічному дослідженні показано, що у зразках які були отримані від тварин з ЛОС, які вживали меланін не відбувалося патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу, відбувається відновлення уражених тканин стравоходу вже на 21 добу.

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

## SUMMARY

**Raietska Yana. Biochemical mechanisms of chemical burns of the esophagus.** – Manuscript.

Dissertation for the Degree of Doctor of Biological Sciences in the specialty 03.00.04 - Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2019.

According to the World Health Organization, burns rank third among other injuries. The urgency of the problem of esophageal chemical burns (ECB) is determined by the relatively high frequency of them in everyday life, the severity of burn injury, the complexity, and duration of treatment of such patients, frequent disability and high mortality. The type of agent that causes ECB is most often distinguished: alkaline and acidic. The severity of ECB depends on the amount and concentration of chemical used. Today, it is important to clarify the role of proteolysis in the molecular mechanisms that accompany the processes of esophageal mucosal healing and to experimentally justify the feasibility of using melanin to correct regenerative processes under these conditions.

The dissertation is devoted to the investigation of the role of proteolysis processes in molecular biochemical mechanisms that accompany the healing processes of esophageal chemical burns (ECB). The alkaline esophageal burn was simulated using a solution of 20% NaOH, the esophageal acid burn was reproduced by the introduction of 30% trichloroacetic acid (CCl<sub>3</sub>COOH) corresponding to the II degree of burn injury.

One of the main diagnostic criteria for the severity of ECB is the determination of serum biochemical parameters that correlate with the functional state of the body and the degree of metabolic disorders in the subject. The main biochemical parameters in serum were determined under conditions of both

alkaline and acidic esophageal burns. Both types of ECB showed a decrease in the concentration of total protein and albumin, an increase in products of urea and creatinine nitrogen metabolism, an increase in aspartate aminotransferase activity, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase, and ion exchange rates changed. Thus, the features of metabolic processes in the blood of rats for alkaline and acid burns of the esophagus are shown, which testify to profound changes in the functioning of the major systems and organs in the development of pathological consequences of the esophageal lesion.

There are a large number of inflammatory mediators in the burn, which activate the inflammatory process, which increases the content of proinflammatory cytokines after burn against the deficiency of anti-inflammatory cytokines; An increase in the level of proinflammatory cytokines after burns was observed against the background of deficiency of anti-inflammatory cytokines, which was accompanied by an increase in the content of medium and low molecular weight circulating immune complexes. Such changes in the cytokine profile coincide with the activation of proteolysis and indicate a slowing of wound healing.

The ECB has seen an increase in the activity of both NOS isoforms, which can adversely affect the healing processes of esophageal burns, because at high concentrations of NO it can affect cells, producing a toxic effect associated with the formation of an oxidant - peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which has a negative effect on tissues, disrupting the structure of cell membranes, as well as altering energy metabolism in the cell and DNA synthesis. In the study of the antioxidant system, it was found that under the conditions of the ECB there was a violation of the prooxidant-antioxidant balance. Esophageal burns on the background of increased activity of lipid peroxidation processes (diene conjugates, thiobarbituric acid-active products) significantly inhibited the mechanisms of antioxidant protection (superoxide dismutase activity). Violations of the oxidation-antioxidant equilibrium have been found, namely the increase in the level of lipid and protein

oxidation products, and the dysregulation of antioxidant enzyme systems, which leads to changes in the activity of proteinases and their inhibitors by the ECB.

It has been proved that during esophageal burns, there is an increase in total proteolytic activity and activity of Matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteinases, an increase in MMPs content and a decrease in tissue inhibitor of metalloproteinases - 1 (TIMP-1) content, which affects the accumulation of low-molecular-weight proteins of the intercellular matrix and demonstrates systemic proteolytic disbalance.

Changes in the proteolytic profile of the ECB have been shown, with an increase in proteolytic activity and activity of serine proteinases and MMPs in blood plasma. The activity of  $\alpha$ 2-macroglobulin and  $\alpha$ 1-antitrypsin is increased. Increases MMP content against the backdrop of reducing the content of TIMP-1. We found an increase in the content of MMP 2 and MMP 9 in the tissues since damage to tissues MMP enter the blood, we investigated the increase in the content of MMP 2 and MMP 9 in the bloodstream. The high activity of MMPs leads to the activation of plasminogen and its conversion to plasmin. As a result, there is an excessive increase in plasmin activity and its autocatalysis.

Esophageal burns are accompanied by changes in the humoral level of the immune system and the appearance of autoantibodies in the bloodstream, as indicated by an increase in IgG content. Chromatographic method yielded a fraction of trypsin-like serine proteinases and showed that, under ECB conditions, their plasma concentrations increased for 7 days. The analysis of the qualitative composition of trypsin-like serine proteinases shows the formation of degraded forms of plasmin and the presence of neutrophil elastase. Analysis of the relative content of protein fractions in serum under conditions of alkaline and acid burns of the esophagus showed an increase in the globulin fraction and a decrease in albumin. Analysis of protein fractions in the esophageal mucosa under conditions of alkaline and acidic esophageal burns showed the formation of low molecular weight fractions, indicating the activation of the proteolytic system. When

determining the content of medium-weight molecules in serum and mucous membranes, an increase in the content was shown, mainly by 7 days of studies. When analyzing the enzyme in the esophageal mucosa, we found a fraction that may correspond to MMP-7, which is a prognostic marker of malignant degeneration of esophageal tissues. We have found an increase in the content of MMPs in tissues and bloodstream, and as a result of the formation of atypical forms of proteins, such as products of protein degradation (degraded forms of plasmin, neutrophil elastase), changes in the protein profile, molecules of medium mass, overexpression of MMP-7, autoimmune (IgG). Thus, the disruption of proteolysis (and its cyclic nature), as well as the increased concentration of atypical forms of proteins adversely affect the regeneration processes.

Thus, analyzing regenerative processes under ECB conditions, we showed an increase in the level of *Ptgs2* and *Tgfb1* mRNA expression, indicating pathological healing processes, decrease in FGF content, histological studies indicate that there is residual leukocyte infiltration and excessive tissue infiltration under ECB conditions.

Thus, the data presented show that, under ECB conditions, the balance between proteinases and their inhibitors in blood plasma is impaired. The increase of proteolytic activity and activity of proteinase inhibitors is shown. An increase in the low molecular weight forms of plasmin was detected, which may indicate its excessive activation. 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 the esophageal burn 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 conditions of alkaline esophageal burns 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 alkaline esophageal burns. We conducted an

analysis of protein fractions under conditions of alkaline esophageal burns for the introduction of melanin. A decrease in the globulin fraction and an increase in albumin were shown. When determining the content of medium-mass molecules in serum and mucous under conditions of alkaline burns of the esophagus and melanin, a decrease in the content of medium-mass molecules was shown in comparison with the burn. When analyzing the enzyme in the esophageal mucosa for alkaline esophageal burns for the introduction of melanin, we did not detect (previously present) a fraction that may correspond to MMP-7, which may be a prognostic marker of malignant esophageal tissue degeneration. We determined the serum IgG content. A decrease in IgG has been shown in comparison with results associated with alkaline gastric burns. When using melanin under conditions of esophageal burns, the formation of atypical protein fractions is not observed, which may indicate the normalization of proteolytic processes and primary lesions.

The level of mt expression of *Ptgs2*, *Tgfb1* genes was determined under ECB conditions and for the introduction of melanin into the blood and esophageal mucosa, and a decrease in the studied parameters during all terms were compared with alkaline esophageal burns. The relative content of fibroblast growth factor under the conditions of alkaline esophageal burns and for the introduction of melanin was determined. The histochemical and morphometric analysis evaluated the effect of melanin on these processes, showed less pronounced collagen fiber formation in damaged esophageal tissues, indicating the anti-inflammatory and anti-fibrotic properties of these substances. Histological examination showed that in specimens obtained from animals with alkaline esophageal burns that consumed melanin did not occur pathological growth of extracellular matrix, there is a recovery of the affected tissues of the esophagus for 21 days.

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

### Список публікацій здобувача

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.

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.

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 Шевченко. 2015; 68: 19-23

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.

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 Шевченко. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 19 2(19): 15-19.

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.

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 Шевченко. 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.

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.

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.

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

13. Коваль Т.В., Іщук 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.

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

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 *R. Vulgaris* Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2017; 1(22): 36-39.

16. Іщук 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.

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

18. Chornenka N.M., Raetska Y.B., Savchuk O.M., Torgalo E.O., Beregova T.V., Ostapchenko L.I. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5): 1042-1047.

19. Chornenka N.M., Raetska Y.B., 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.

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.

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.

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

23. Koval TV., Ishchuk TV., Grebinyk DM., **Raetska Ya B.**, Sokur OV., Savchuk OM., Ostapchenko LI. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn. *Biomedical Research*. 2018; 29 (16): 3169-3173.

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 p. – С. 67-68.

31. Поталіцин П., Іщук Т., **Раєцька Я.** Визначення біохімічних показників сироватки крові статевонезрілих щурів при моделюванні опікового 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 sunderesophagealacidburnmodelof 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 молодь 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., **Raetska 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 aqueous 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.**, Koval TV, Savchuk OM., Ostapchenko LI. 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.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	24
<b>ВСТУП</b>	26
<b>РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ ЗАГОЄННЯ ОПІКІВ ТА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛІЗУ</b>	34
1.1 Загальні відомості про хімічні опіки стравоходу	34
1.2 Процеси загоєння опікових ран	38
1.3 Екстрацелюлярний та цитоплазматичний протеоліз	47
1.4 Потенційні методи лікування при хімічних опіках стравоходу	56
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.</b>	62
2.1 Реактиви та матеріали	62
2.2 Обладнання	63
2.3 Дотримання положень про гуманне ставлення до тварин.	63
2.4 Моделювання хімічного опіку стравоходу	64
2.5 Умови проведення експерименту	65
2.6 Отримання сироватки крові	65
2.7 Отримання плазми крові	66
2.8 Отримання слизової оболонки стравоходу	66
2.9 Визначення концентрації білка за методом Бредфорд	66
2.10 Дослідження морфофункціонального стану клітин крові у щурів	67
2.10.1 Визначення загального білка сироватки крові	67
2.10.2 Визначення концентрації альбуміну	68
2.10.3 Визначення концентрації сечовини	68
2.10.4 Визначення концентрації креатиніну	68
2.10.5 Визначення концентрації йонів натрію	69
2.10.6 Визначення концентрації йонів калію	69
2.10.7 Визначення концентрації хлоридів	70

2.10.8	Визначення концентрації магнію	70
2.10.9	Визначення концентрації кальцію	70
2.10.10	Визначення активності аспаратамінотрансфери (АСаТ)	71
2.10.11	Визначення активності аланінамінотрансфери (АЛаТ)	71
2.11	Гістологічний аналіз зрізів стравоходу щурів	71
2.12	Визначення вмісту дієнових кон'югатів і шифових основ ненасичених жирних кислот	73
2.13	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів	73
2.14	Визначення супероксиддисмутазної активності	74
2.15	Визначення каталазної активності.	75
2.16	Визначення концентрації SH-груп	76
2.17	Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону	76
2.18	Визначення глутатіонпероксидазної активності	76
2.19	Визначення глутатіонтрансферазної активності	77
2.20	Визначення глутатіонредуктазної активності	78
2.21	Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів	79
2.22	Визначення активності NO-синтази	79
2.23	Одержання та характеристика поліклональних антитіл	81
2.24	Метод вестерн-блотингу	81
2.25	Отримання фракції тромбоцитів	82
2.26	Електрофорез в поліакриламідному гелі	82
2.27	Ензим-електрофорез	83
2.28	Хроматографія для виділення трипсиноподібних серинових протеїназ	83
2.29	Визначення загальної протеолітичної активності, активності металопротеїназ та серинових протеїназ	84
2.30	Визначення активності $\alpha_1$ -антитрипсину та $\alpha_2$ -мактроглобуліну	85

2.31	Визначення кількості молекул середньої молекулярної маси	87
2.32	Визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, імуноглобулінів класу G (IgG), тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ та фактору росту фібробластів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу	87
2.33	Визначення протеасомної активності	88
2.34	Кількісна ЗТ-ПЛР	89
2.34.1	Виділення сумарної РНК з крові та тканин стравоходу щурів	89
2.34.2	Оцінка рівня експресії генів	90
2.35	Статистична обробка результатів	92

### **РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ЗА ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ**

3.1	Метаболічні процеси за хімічного опіку стравоходу в щурів	93
3.2	Запальний процес за хімічного опіку стравоходу щурів	109
3.3	Оксидативний стрес за хімічного опіку стравоходу щурів	118

### **РОЗДІЛ 4 ХАРАКТЕРИСТИКИ СИСТЕМИ ПРОТЕОЛІЗУ ЗА ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ**

4.1	Протеолітичний баланс сироватки/плазми крові за хімічного опіку стравоходу	135
4.2	Протеолітичний баланс слизовій оболонці за хімічного опіку стравоходу	151
4.3	Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов хімічного опіку стравоходу	164

### **РОЗДІЛ 5 МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ**

5.1	Процеси загоєння за умов хімічного опіку стравоходу	191
-----	---	-----

<b>РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ (ЗАГОЄННЯ) ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ</b>	<b>203</b>
6.1 Біохімічні параметри крові та слизової оболонки стравоходу за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну	203
6.2 Вплив меланіну на перебіг процесів протеолізу в біохімічних механізмах загоєння опіку стравоходу	217
6.3 Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов опіку стравоходу та за введення меланіну	223
6.4 Процеси загоєння за умов хімічного опіку стравоходу за введення меланіну	232
<b>РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	<b>247</b>
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>271</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	<b>273</b>
<b>ДОДАТКИ</b>	<b>315</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

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

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини;  
МСМ – молекули середньої маси;  
ОП – олігопептиди;  
IgG – імуноглобуліни класу G;  
ЦКК – циркулюючі імунні комплекси;  
БАЕЕ – N-бензоїл-L-аргінінетиловий ефір;  
НСТ – нітросиній тетразолій;  
НАДН – нікотинамідаденідинуклеотид;  
ФМС – феназинметасульфат;  
ФРФ – фактор росту фібробластів;  
ІІ – інтерлейкін;  
ІФН- $\gamma$  – інтерферон- $\gamma$   
EGF – епідермальний фактор росту;  
ФНП- $\alpha$  – фактор некрозу пухлин;  
БСА – бичачий сироватковий альбумін;  
Ptgs2 - prostaglandin-endoperoxide synthase 2;  
Tgf- $\beta_1$  – transforming growth factor beta 1  
Hps – білок теплового шоку;  
GSH – відновлений глутатіон;  
GSSG – окиснений глутатіон;  
КП – каспазоподібна активність протеасом;  
ХТП – хімотрипсинподібна активність протеасом

## ВСТУП

**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, тяжкістю опікової травми, складністю і тривалістю лікування таких хворих, частою інвалідизацією та високою летальністю [1]. За видом агента, що викликає ХОС найчастіше розрізняють: лужні та кислотні [2]. Тяжкість ХОС залежить від кількості та концентрації вжитої хімічної речовини [3].

Опіки супроводжуються запальною реакцією [4, 5], розвитком синдрому ендогенної інтоксикації [6, 7, 8] порушенням функціонування про-антиоксидантної системи [9]. Внаслідок цих процесів відбувається порушення регенеративних механізмів в тканинах стравоходу та перехід процесу загоєння в хронічну форму [1], з формуванням надлишкової грануляційної тканини, часто з розвитком надмірного фіброзу, що призводить до рубцевої контрактури [7, 10], втрати повноцінних функцій органу [11, 12], аденокарциноми стравоходу [13-17]. Процеси протеолізу мають безпосереднє відношення до реакцій запалення та деструкції тканин [1, 18, 19] і є необхідною умовою нормального перебігу регенерації [17-20].

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 [1, 18, 21], що є однією з патогенетичних ланок у розвитку деструктивних та запальних процесів [19, 22]. 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 [23, 24].

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 [25]. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками, потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищати рану від бактеріальних інфекцій [26-30]. 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 [31, 32].

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

метаболических процессов в организме за условий развития патологических состояний» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 гг.).

**Мета та задачі дослідження.** Метою роботи було з'ясувати роль процесів протеолізу в молекулярно-біохімічних механізмах ушкодження та регенерації 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 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 напрямку 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), PHOENIX, International Medical Students' Conference (India, 2017), V Міжнародній науково-практичній конференції, «ЗНУ» (Запоріжжя, 2017), 14th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry (Germany, 2017), 25th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (Netherlands, 2018).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 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.

**Висновок біоетичної експертизи.** Згідно з висновком комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протоколу № 3 від 25 вересня 2017 р.) експериментальні дослідження не суперечать загально прийнятим біоетичним нормам з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень. Дослідження виконано відповідно до вимог Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської

34 конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та відповідно до Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" [44, 45].

## РОЗДІЛ 1

### ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ ЗАГОСННЯ ОПІКІВ ТА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛІЗУ

#### 1.1 Загальні відомості про хімічні опіки стравоходу

На сьогоднішній день опіки це найпоширеніша і руйнівна форма травм. В останні роки відсоток виживання пацієнтів, що отримали опікові травми, зріс завдяки прогресу в сучасній медичній допомозі. Проте, за даними статистики у всьому світі, опіки займають перше місце серед причин дитячого травматизму. Тільки в Україні, щороку, більше 10 тисяч дітей отримують опікові травми. Діти від 1 до 8 років - найбільш постраждала група [46,47].

Внаслідок потрапляння на тканини організму певних хімічних речовин виникає хімічний опік. ХОС виникають при випадковому або навмисному прийомі агресивних рідин (лугів, кислот, солей важких металів та ін.). В західних країнах однією з поширених причин хімічних опіків стравоходу є лужні агенти. Кислотні агенти більш поширені в країнах, що розвиваються. В нашій країні, за останні роки, кількість пацієнтів з опіком стравоходу, викликаних побутовими засобами, які містять оцтову кислоту (очищувачі каналізаційних труб, засоби для видалення плям, чищення металевих конструкцій, розчинники, антикорозійні речовини, домашні чистячі та антикорозійні засоби) збільшилася майже в 2 рази. Число опіків, викликаних засобами, що містять у своєму складі луги (засоби для очищення сантехнічного обладнання, пральні засоби, елементи живлення) зросло більш ніж у 3,5 рази. Тяжкість отриманої хімічної травми залежить від характеру діючої речовини, від часу дії та об'єму реагенту, від своєчасного надання медичної допомоги [46-49, 66-68].

При лужних опіках розвивається колікваційний некроз, з гострим запальним процесом тканин травного тракту внаслідок чого відбувається омилення жирів та пошкодження білків слизової оболонки ШКТ. При потраплянні лугу на тканини організму відбувається пошкодження тканинних структур, вони ніби розріджуються в результаті, майже не перешкоджають подальшому проникненню пошкоджуючого агента до глибших шарів стінки стравоходу. Вплив лугів на тканини призводить до тромбозу в кровоносних судинах, що перешкоджає притоку крові до вже пошкоджених уражених тканин. Цим пояснюється, те що колікваційний некроз тканин широкий та глибокий, навіть, при прийомі відносно невеликих кількостей концентрованих лугів. Прийом таких лугів, як натрію гідроксид, гідроксид амонію, кальцію оксид та інші, навіть при невеликих кількостях призводить до дегідратації та розрихлювання тканин стравоходу, а це дозволяє лугу проникати значно глибше в стінку стравоходу з утворюючи великі і чисельні вогнища некрозу. Струп, який утворюється при цьому м'який і пухкий, легко травмується. Глибокі пошкодження тканин розвиваються після впливу лужних агентів, що пов'язано з їх більш глибоким проникненням в тканини [69-71].

При кислотних опіках глибина ураження менша, порівняно з опіками, які викликані лугами. Кислоти призводять до агрегації білків клітини нейтралізуючи лужне середовище тканин. При впливі кислоти на ШКТ, зокрема стравохід, відбувається утворення коагуляційного некрозу, який перешкоджає подальшому проникненню вглиб слизової оболонки каустичного агента. Потрапляння невеликої кількості концентрованої кислоти в організм може бути причиною важких, нерідко смертельних ускладнень внаслідок інтоксикації. При дії неорганічних кислот (сірчана, азотна, соляна, фторна) відбуваються виражені локальні зміни, обумовлені некрозом стінки стравоходу та утворенням тріщин, ерозій на слизових оболонках ШКТ, які були в контакті з кислотою. При дії органічних кислот

місцеві зміни виражені в меншій мірі, але через відсутність щільного рубця слизової оболонки ШКТ кислота може легко проникати у кров. Саме тому, при отруєнні, наприклад, оцтовою кислотою, на перший план виступають симптоми важкої інтоксикації [67-69, 72-75].

На сьогоднішній день дослідженню патогенезу ХОС у дорослих присвячено досить велика кількість робіт, щодо дітей, то вона набагато менша. Відомо, що у результаті опікової травми, спричиненою хімічним агентом відбувається різке подразнення рецепторів слизової оболонки, яке викликає інтенсивним спазмом м'язів стравоходу в місцях його фізіологічних звужень. При потраплянні хімічної речовини в стравохід опік найчастіше локалізується в шийному відділі і у кардії, де агресивний реагент затримується довше, викликаючи найбільш тяжкі ушкодження. Проте, якщо цю рідину випивають «залпом», то їдка речовина потрапляє відразу в шлунок. Опіки одночасно стравоходу і шлунка зустрічаються у 25% від загальних випадків ШКТ. Оскільки у дітей тимчасово анатомічно дещо стискає стравохід, у разі проковтування хімічних речовин відбуваються більш важкі ураження верхньої третини стравоходу, де їдка речовина затримується довше. За умов ХОС першим уражується надгортанник, який в перші секунди «оберігає» організм від попадання хімічної речовини на голосові зв'язки, тим самим, від негайної смерті хворого від асфіксії внаслідок їх рефлекторного змикання [76-78].

На сьогоднішній день лікарі при діагностуванні ХОС у дітей ґрунтуються на анамнезі: сліди останніх опіків та хімічних реагентів на губах, слизових оболонках, глотці. Основним методом підтвердження або спростування наявності хімічної травми стравоходу та визначення ступеня ураження стравоходу є первинне ендоскопічне дослідження. За результатами ендоскопічних обстежень виділяють наступні стадії опіку стравоходу: I - гіперемія слизової оболонки та набряки; II - ураження слизових і підслизових оболонок; III - травма всіх стравохідних оболонок. Визначити точний ступінь

ураження стравоходу, буває дуже складно. Повторні ендоскопічні обстеження та ретельне спостереження за динамікою лікування дають більш повну картину [48, 79].

При хімічних опіках існує ряд ускладнень, залежно від того, коли вони виникнули їх можна розділити на ранні та пізні ускладнення. До ранніх відносять перфорацію, гемоліз, ерозії, пневмонії, сепсис. До пізніх: рубцевий стеноз, розлади нервової системи. Ускладнень можна запобігти, якщо правильно розробити комплексний підхід при лікуванні, а саме: своєчасна і повна терапія в гострому періоді захворювання, систематичний моніторинг захворювання в динаміці [49].

Більшість хімічних пошкоджень у дорослих є поверхневими, які швидко заживають. Однак діти можуть зазнати серйозних ускладнень навіть при першому ступені опіку стравоходу через незрілість тканинних структур стравоходу. Слід зазначити, що опік стравоходу першого ступеня може не супроводжуватися хворобливими симптомами, але відсутність болю не виключає значних порушень структур тканин стравоходу. Основні причини ускладнень, порушень та затяжне відновлення тканин після опіку стравоходу у дітей є недосконалість захисних реакцій. За опіку навіть першого ступеня, можуть розвиватись такі опікові ускладнення: патологічне загоєння, розвиток стриктур, стриктур. У більшості випадків корекція ускладнень можлива лише хірургічним шляхом. Складнощі виникають у діагностиці ускладнень у дітей, у більшості випадків вони не в змозі адекватно оцінити стан та надати інформацію про характер шкідливого чинника. Лікарям важко зробити висновок про те, чи дитина вжила хімікат чи ні, тому що існує кілька загальних симптомів при ізольованому догляді за ротовою порожниною та стравоходом. Таким чином, при діагностиці опікових уражень стравоходу не можна ставити діагноз лише на симптомах. У клінічній медицині найпоширенішим є механічне перенесення опікових форм у дорослих до дитячої клініки. Для пошуку нових ефективних методів лікування необхідно

вивчити особливості механізмів загоєння опіків стравоходу у дітей. Отже, системне уявлення про склад найпоширеніших хімічних речовин та механізми їх впливу на тканини стравоходу сприятиме розробці нових моделей опіку стравоходу. Продовження роботи у цьому напрямку дасть можливість більш детально вивчити особливості механізмів загоєння опіків стравоходу у дітей та причинно-наслідкові зв'язки патологічних змін за даної патології [50-53, 80].

## **1.2 Процеси загоєння опікових ран**

У відповідь на отримання травми активується природний процес – загоєння. На ранній стадії загоєння переважає запалення, далі переходить до відновлення та реконструкції ушкоджених тканин. Є ряд морфологічних відмінностей у будові стравоходу і шкіри, так у стравоході - багат шаровий плоский незроговілий епітелій, який не має здатності до зроговіння з часом. При такій відмінності у шкірі та стравоході процес загоєння після опікових ран протікає схоже і включає всі етапи розвитку ранового процесу [54, 55, 81].

Процес регенерації тканин включає три послідовних фази: запалення, проліферація і фаза ремоделювання. Спочатку розглянемо, що собою являє репаративна регенерація - це відновлення клітин, тканин або органа після травми, або за різних патологічних процесів. [34] Це складний процес, який викликаний руйнуванням структур, кількісно перевершуючи допустимі межі фізіологічної регенерації. В основі регенерації пошкодження лежать такі ж механізми, форми регенераторної реакції, які властиві фізіологічній регенерації. Репаративна регенерація пошкодження в кожному із органів відбувається тільки тим же шляхом, в якому в ньому здійснюється фізіологічне оновлення його структури. Репаративна регенерація може бути повною і неповною. Повна регенерація - характеризується заміщенням дефекту тканиною,

повністю ідентичною зруйнованій. Неповна - дефект заміщується щільною волокнистою сполучною тканиною - рубцем. Регенерація кожної тканини має свої особливості але завжди включає в себе процеси розпаду пошкоджених клітин та міжклітинної речовини, становлення міжклітинних зв'язків у вигляді інтеграції та адаптаційної перебудови регенерату. За типом проліферативної активності сполучні тканини можна віднести до групи повільно регенеруючих, для яких характерна клітинна форма регенерації [250-253].

Запалення - це типовий патологічний процес, сформований як захисно-приспосувальна реакція організму на вплив патогенних факторів, скерована на локалізацію, знищення та видалення флогогенного агенту, а також на усунення наслідків його дії. Запалення виникає у разі ушкодження тканин і характеризується порушенням кровообігу, зміною крові та сполучної тканини у вигляді альтерації, ексудації і проліферації. Запалення як системна захисна реакція організму, що спрямована на зниження та елімінацію всього стороннього, яка досягає своєї біологічної мети здебільшого за допомогою: дегрануляції опасистих клітин; активації системи комплементу; зростання проникності мікросудин і адгезивної здатності ендотелію; міграції плазми крові в міжклітинний простір; адгезії до ендотеліальних клітин нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів циркулюючої крові і їх вихід в інтерстицій; б) фагоцитозу, бактерицидного та цитолітичного впливу фагоцитів; розширення, спазму і тромбозу мікросудин; заміщення дефекту тканин через ангиогенез та проліферацію фібробластів. Запалення, як і будь-яка захисна реакція організму, є надмірна стосовно стимулів, що її викликали і тому досить часто трансформується в типовий патологічний процес [254-256]..

Нейтрофіли відіграють важливу роль у запаленні та автоімунних синдромах . Ці клітини мають індукований активацією комплекс НАДФН-оксидазу - фермент, що перетворює молекулярний кисень на супероксид аніон, який ініціює шлях утворення молекул окиснювачів, що володіють як

токсичними властивостями, так і властивостями сигнальних молекул . Останнє десятиріччя характеризується зміною уявлення про нейтрофіли як короткоживучі, неспецифічні, здатні тільки до фагоцитозу або екзоцитозу клітини, що руйнують свої тканини, на уявлення про специфічну зброю, що швидко мобілізується, яка кардинально залучена до активації ендотелію, моноцитів, макрофагів, дендритних клітин і Т-лімфоцитів, тобто на уявлення про нейтрофіли як головні менеджери імунного захисту. Також нейтрофіли очищають рану від уламків позаклітинного матриксу та патогенів, здатні секретувати хемоатрактанти (TGF- $\beta$ , MCP-1) та активувати моноцити, сприяючи їх диференціювання в макрофаги. Лімфоцити забезпечують імунну відповідь. Фібробласти в свою чергу разом з макрофагами утворюють грануляційну тканину – тимчасовий матрикс, який виконує механічну і регуляторну функції [60-62, 85, 86].

Джерелом диференціації макрофагів поряд із дендритними клітинами, моноцитами, нейтрофілами та гладкими клітинами є стовбурові гемопоетичні клітини кісткового мозку. Роль макрофагів полягає у підтримці гомеостазу. Також приймають участь у ремоделюванні тканин та у фагоцитозі. Макрофаги універсальними клітинами імунної системи. Макрофаги синтезують про- і протизапальні цитокіни залежно від типу стимулів. Таким чином, макрофаги є ключовими клітинами, які визнають ефективність запального процесу. Вони виділяють колонієстимулюючий фактор - цитокін, який дифундує у кров для гематопоетичних клітин-попередників кісткового мозку. Також макрофаги секретують інші цитокіни, такі як фактор некрозу пухлин альфа (ФНП- $\alpha$ ) і інтерлейкіни 1 і 6 (ІЛ-1,6) [85-87, 199-202]. Макрофаги секретують фактори росту TGF- $\beta$ , SDF-1, VEGF, PDGF. В результаті формується їх градієнт від запалення до тканинах і судинах, який задає напрямок і стимулює хемотаксис клітин мезенхімальної природи [86-87].

Фібробласти секретують у міжклітинний простір фібронектин, колаген. Вони здатні експресують позаклітинні протеїнази, за допомогою яких змінюється структура первинного фібринового матриксу з утворенням грануляційної тканини. Також відомо, що мезенхімальні клітини – МСК, фібробласти і міофібробласти – синтезують колаген, як правило, III-го типу, і так ремоделюють грануляційну тканину, поступово заміщуючи її колагеновим матриксом [88-90].

Фаза регенерації включає подальше ремоделювання та відновлення структури і функції тканини. В цей період фібробластами, секретуються колаген I типу та ММП. ММП, в свою чергу деградують колаген. Поступово активність фібробластів знижується, вони виходять із зони пошкодження шляхом апоптозу. В цей час рани зближуються, а область рани заміщається рубцем [90-92].

Потім починається фаза регенерації. Створюється грануляційна тканина, яка далі заміщається на постійну. Такий перехід визначає, чи буде рана заповнена рубцевою тканиною, чи буде регенерація з відновленням активності тканини. Патологічні рубці є прикладом коли йде активна проліферативна активність фібробластів, яка спричиняється цитокінами. Відомо, що фібробласти синтезують протеїнази, тромбоцитарний фактор росту, епідермальний фактор росту, колаген, еластин. Підвищення рівня функціонально активних фібробластів визначає характер подальших змін рубцевої тканини. [93-95, 200-207].

Рубцювання має чотири стадії протікання рубцевого процесу: 1 - ранніх рубцевих змін, 2 - стабілізації рубцевого процесу, 3 - розвитку стійких рубцевих змін, 4 - відтермінованих наслідків хімічної травми стравоходу [96, 195-200]. При запаленні відбуваються такі процеси: надходять нейтрофіли, відбувається створення матричного каркасу, вивільнюються цитокіни. За проліферації відбуваються такі процеси: ангіогенез, синтезується колаген, відбувається реепітелізація, зменшення ранової поверхні. Клітини ендотелю

активують ангиогенез, колаген утворюють фібробласти та фібронектин. При реконструкції матриці відбувається утворення та осадження колагену фібробластами. Міжклітинна сигналізація до якої входить цитокіни, фактори росту контролює процес загоєння. Профібротичні та антифібротичні молекули складають мережу в якій відбуваються різноманітні взаємодії всередині під час процесу загоєння [91, 93, 95].

Опікову рану можна розділити на три зони, це залежить від руйнування тканин та кровотоку. Зона коагуляції, відома як центральна частина рани, страждає найбільшою кількістю та сили від шкідливого агента. Зона коагуляційного некрозу після опіку характеризується морфологічною незворотністю зміни і відсутність кровообігу, У цій зоні тканини залишаються живими, але внаслідок пошкодження судинної системи спостерігаються порушення мікроциркуляції. Надмірне потрапляння шкідника на місце ураження призводить до денатурації білка, деградації та згортання, що спричиняє некроз тканин. Зона згортання, є областю застою або ішемії, саме в цій області некроз тканини може виникнути протягом 48 годин після опіку за відсутності медичного втручання. Механізми, що лежать в основі апоптозу та некрозу в області ішемії, залишаються недостатньо вивченими. Зона гіперемії, або крайня область опікової рани, яка має підвищений кровообіг, дана зона зазвичай, за нормального загоєння, відновлюється [69-70, 97, 98].

Опіки багато в чому відрізняються від інших ран, але загоєння всіх ран - це динамічний процес із схожими стадіями. Початковий запальний процес є результатом надходження нейтрофілів та моноцитів. Вони потрапляючи до рани викликають імунну відповідь, яка згодом підтримується низкою макрофагів та хемокінів. Процеси, які відбуваються під час запальної фази мають на меті не тільки запобігти зараженню під час одужання, одна з головних їх функцій, це знищення некротичних тканин. Таким чином, за умов опікової травми підвищується проникність судин. Такі зміни сприяють

потраплянню різних клітин. Потрапляють в зону травми різні макропопуляції, включаючи поліморфонуклеарні лейкоцити, мононуклеарні лейкоцити, які потім дозрівають до макрофагів та до лімфоцитів [66, 79, 195-198].

Моноцити грають важливу роль на ранніх стадіях процесу загоєння ран. Поліморфонуклеарні лейкоцити також виконують важливу функцію, а саме видаляють фрагменти некротичних тканинних, також вони необхідні для руйнування бактерій та фрагментів некротичної тканини. Нейтрофіли мають велике значення, оскільки вони продукують вільні радикали кисню та лізосомальні ферменти, включаючи протеїнази, колагенази та еластази. Таким чином, нейтрофіли допомагають боротися з інфекціями та очищаючи та лікуючи рани. Лімфоцитарні комплекси макрофагів слугують основою фагоцитозу. Ці комплекси можуть продукувати речовини що здатні впливати на організм. В рановому процесі активно беруть участь фагоцитарні клітини, вони приймають участь у фазі самоочищення, набряку, відторгнення мертвих клітин. Запалення - це важливий процес, для ефективного забезпечення імунного сигналу слугують медіатори запалення (цитокіни, кініни, ліпіди тощо), для лейкоцитів, а також макрофагів, які приймають участь проліферативній фазі [98-101, 208-210].

В результаті дії медіаторів настає остання фаза запалення: проліферація. Під час цієї фази відбувається активація фібробластів цитокінами. До тканин, які зазнали пошкоджень потрапляють фібробласти і кератиноцити допомагаючи відтворити васкуляризацію. Цей процес є важливим за процесу загоєння ран. Таким чином, можна сказати, що для покращення процесів загоєння важлива є взаємодія між стромальними, ендотеліальними та імунними клітинами [102, 103, 211-215].

Фібробласти потрапляють в зону рани завдяки осадженню фібрoneктину, який утворює каркас. Після затихання запального процесу, збільшується число фібробластів. Фіброцити, є похідними сполучної

тканини, а також, є джерелом фібробластів. Вони вироблюють різноманітні активні компоненти для загоєння ран, глікозамінглікани та колаген. Фібробласти здатні синтезувати глікозаміноглікани, протеоглікани, що являють собою складні полісахариди необхідні для утворення ранньої грануляції. Вихідним матеріалом для синтезу глікозаміногліканів та протеогліканів є моно- та олігосахариди. Чотири основні глікозамінглікани включають такі речовини: дерматин сульфат, гепаринсульфат, гіалуронову кислоту, хондроїтин-4-сульфат. Таким чином, вони створюють міжклітинний матрикс, який має велике значення у подальшому утворенні колагену та формуванні рубця. Протеоглікани зв'язуються з колагеном та вносять вклад в структурну організацію колагенових волокон, вони проявляють захисні реакції від дії колагеназ і протеїназ. Коли відбувається фібробластична проліферація, то утворюється колаген. Його кількість зростає, після чого концентрація синтезу колагену досягає постійного рівня, при якому він стає рівним щільності лізису колагену [79,102, 104].

Особливе місце при розвитку патологічних процесів відводиться ММП. Вони відіграють важливу роль в білковому обміні сполучної тканини в здорових і пошкоджених органах. Характерної особливості сполучної тканини є наявність, крім клітин сполучної тканини, також межклітинного матрикса. Основними компонентами матрикса є фібрилярні білки (колаген і еластин) і полісахариди. Матричні металопротеїнази - представники сімейства цинкових протеїназ, приймають участь у деградації протеолітичних компонентів, які перебувають в позаклітинному матриксі. Ключовим моментом регуляції ангіогенеза є баланс ангіогенних і ангіостатичних факторів, який, як вважається, визначає хід ранового процесу. Сучасні досягнення протеолізу показали, що для нормального розвитку, фізіологічного оновлення, відтворення здорових тканин головним чином використовуються дві групи білків, а саме, матричні металопротеїнази і їх тканеві інгібітори [105-109]

Субстратами ММП використовуються фактори росту, хемокіни, протеїнази, адгезивні молекули та компоненти позаклітинного матрикса. Особі білки - фактори транскрипції, контролюють рівень ММП. Велика частина ензимів виражається у формі неактивних проферментів. Синтез металопротеїназ стимулюють фактори росту, гормони, цитокіни, адгезивні молекули, компоненти, позаклітинного матриксу та АФК. Патологічна експресія ММП пов'язана з багатьма процесами, в тому числі з ангіогенезом, артритамі, атеросклерозом. Вважається, що головним джерелом ММП при запаленні є нейтрофіли та макрофаги [110-112].

Фібробласти це клітини, які утворюють грануляційну тканину та продукують колаген, еластин, фібронектин, сульфатовані і нессульфатовані глікозаміноглікани. Частина клітин надходить до з високим рівнем хемотаксинів та факторів росту. Фібронектин виступає опорною сіткою для міграції міофібробластів. В процесі приймають участь наступні фактори: епідермальний фактор росту, макрофагальний фактор росту, тромбоцитарний фактор росту, тромбін, інсулін, лімфокіни [110-112, 2012-218].

Крім того, показано, що ангіостатин може індукувати апоптоз або зупинку мітотичного циклу ендотеліальних клітин та інгібувати їх міграцію. Є велика кількість робіт, присвячених вивченню механізму дії ангіостатина. Виявлено, що в протеолітичній генерації ангіостатина з приймають участь матричні металопротеїнази. Позаклітинний протеоліз може здійснюватись матриксними металопротеїназами ММП-2, ММП-7, ММП-9 і ММП-12. Зростання активності ММП може приводити до запальної реакції, зниження активності ММП може призводити надмірного утворення ЕЦМ та веде до патологічного загоєння. Рівень ММП зростає при хронічних ранах, при гострому стані рівень матричних знижується. Також при хронічному стані нейтрофільна еластаза вища, ніж при гострому стані. При тривалому зростання активності протеолітичної системи відбувається руйнування ендогенних сполук. ТІМП є головними ендогенними інгібіторами ММП в

тканинах, і вони мають центральну функцію в підтриманні цього балансу. Вони підрозділяються на тканинні та плазматичні. Специфічна взаємодія між ММП і ТІМП є ключовим моментом в регуляції ремоделювання тканин [111-117].

Наявність позаклітинного матриксу, що має великий обсяг, є основою для рубців. Гіпертрофічні рубці мають пухлиноподібну форму, яка виступає над поверхнею шкіри з широким спектром варіацій в розмірі, залежить від місця ураження, терміну та особливостей організму. Келоїди відрізняються стійкістю до терапії і схильністю до рецидивів, вони більш інтенсивно ростуть. Вони як і гіпертрофічні можуть мати зворотній розвиток. Однією з причин регресії рубця є зменшення міофібробластів, які потрапили туди в ході репарації пошкодженої тканини. Міофібробласти мають велике значення у репаративних процесах. Також, розглядають причини регресії рубців це включення в процес деструкції надлишкового матриксу групи ферментів – ММП. Тканинні металопротеїнази утворюються лейкоцитами, фібробластами, кератиноцитами саме через виділення цих клітин здійснюється оборотна дія позаклітинного матриксу [110-114].

Патологічні рубці утворюються внаслідок тривалого або хронічного запалення в рані. Нестача мікроелементів: цинку, міді, магнію, заліза, кобальта, аскорбінової кислоти, аутоімунні розлади, порушення в ендокринній системі це все в більшості випадків призводять до хронічних процесів загоєння ран, внаслідок чого утворюється патологічний рубець. Під час загоєння відбуваються фібро-проліферативні розлади, тому навіть при первинному закритті рани, можливі відхилення від нормального процесу загоєння в сторону його хронізації. Ці процеси можна пояснити порушенням процесу деградації екстрацелюлярного матриксу. А також відкладенням колагену, протеогліканів і фібронектину. Рубці, розрізняють на гіпертрофічні та келоїдних [117, 118].

Фаза епітелізації та реорганізації рубця, це остання фаза загоєння, яка може поєднуватись з проліферативною фазою. Відбувається дозрівання рубцевої тканини, епітелізація рани, утворення волокон колагену та еластину, тобто формування рубцевої тканини. Процес триває 1-2 роки, при цьому не спостерігається зростання колагену, але йде формування колагенових фібрил зміни відбуваються під впливом локальних механічних факторів. Одним з критеріїв лікування рани є епіталізація [118-122].

Таким чином, можна сказати що, процес загоєння післяопікової рани є комплексним процесом, під час якого відбуваються складні метаболічні зміни. Відбуваються складні взаємодії між цитокінами, хемокінами, факторами росту та екстрацелюлярним матриксом. Дослідження процесів загоєння гострих та хронічних ран, є вкрай важливим для пошуку нових схем лікування пацієнтів з хімічними опіками стравоходу.

### **1.3 Екстрацелюлярний та цитоплазматичний протеоліз**

Порушення білкового обміну відіграє важливу роль у патогенезі опікової хвороби. Під час опіків відбувається розпад білка внаслідок зростання активності протеолітичних ферментів. Підвищена активність протеолітичної системи є однією з причин виснаження організму, вона виникає ще на ранніх стадіях опіків. Також відбуваються, зміни фракційного складу білків плазми. Опікова хвороба характеризується зниженням вмісту альбумінів у плазмі, збільшенням вмісту фракцій глобуліну  $\alpha_1$  та  $\alpha_2$ . Дефіцит білка виникає внаслідок втрати їх з ранової поверхні, виділення з сечею і внаслідок поширеного розриву тканини. Процеси біосинтезу білка також порушуються [123].

Поряд з розпадом тканинних та сироваткових білків, відбувається руйнування білків різних ферментних систем, зокрема дезамінази та декарбоксилази, що призводить до порушення двох основних обмінних

процесів у печінці - дезамінування та переїмування амінокислот. Зміни вмісту азоту в крові та небілкових. Таким чином, вміст небілкового азоту в крові обпечених пацієнтів значно збільшується через порушення білкового обміну, про що свідчить збільшення сечовини в крові, аміаку і зокрема креатину. Такі зміни розглядаються як показник токсемії [124-127].

Збільшення в крові поліпептидного азоту, який є проміжним продуктом білкового обміну, який в основному характеризує розпад білків в організмі. Відомо, що накопичення в крові поліпептидів, як і інших продуктів проміжного білкового обміну, має токсичний вплив на організм пацієнта.

Білки крові, їх загальний вміст, а особливо вміст альбумінових та глобулінових фракцій, певною мірою відображають стан пацієнта і, на пізніх стадіях захворювання, є прогностичним критерієм [125-127].

Протеолітична система приймає участь у регуляції обміну речовин в організмі та в ферментативному гідролізі. Протеїнази приймають участь у гідролізі пептидних зв'язків, у біосинтезі білкових молекул. Протеолітичні ферменти - це ферменти класу гідролаз, які каталізують розщеплення пептидних зв'язків. Містяться в усіх живих організмах. Протеолітичні ферменти розрізняють таким чином: пептидази (екзопептидази), та протеїнази (ендопептидази). Представниками протеолітичних ферментів є протеїнази, катепсини. Протеолітичні ферменти належать до класу гідролаз (ЕС 3) і є пептидними гідролазами або пептидазами (ЕС 3.4). Протеїнази поділяються на цистеїн, глутамін, аспарагін, серин, треонін, металопротеїнази та протеїнази зі змішаним або невідомим каталітичним механізмом [128-131].

ММП це група ферментів, яка впливає на розпад колагену та інших білків у позаклітинному матриксі. ММП розділяють на шість груп: желатинази, колагенази, матрилізени, стромелізени, мембрани та некласифіковані металопротеїнази. До ММП належать цинкзалежні ендопептидази в процесах міграції та проліферації клітин ранової поверхні

відіграють важливу роль. Функцій ММП є крім руйнівної вони виконують також регуляторну. Вони здійснюють процесинг біологічно активних речовин. Також ММП контролюють різні клітинні процеси, такі як: проліферація, адгезія, міграція, диференціація, апоптоз. ММП належить головна роль у забезпеченні реепіталізації в ході загоєння. Варто зазначити, що інформація щодо загоєння та ролі в ньому ММП різниці [131].

Основними інгібіторами протеїнази є  $\alpha$ 1-протеїназа ( $\alpha$ 1-ІІІ) та  $\alpha$ 2-макроглобулін ( $\alpha$ 2-MG), які контролюють їх активність, і 10% усіх білків плазми крові є інгібіторами протеїнази.  $\alpha$ 2-MG виконує такі функції: комплекси з протеїназами, утворюючи ферментативні каскадні реакції при згортанні крові, фібриноліз, система хініну та комплемент. Крім того,  $\alpha$ 2-MG бере участь у передачі факторів росту, цитокінів, у моделюванні інфекційних та імунних реакцій. Цей інгібітор утворюється у клітинах запалення та фіброзі. Існує кореляція між прогресуванням фіброзу тканини та складом  $\alpha$ 2-MG. Основні функції  $\alpha$ 1-ІІІ полягають у активності інгібуючої активності трипсину, калікреїну, катексину, хімотрипсину, еластази та інших білкових ферментів.  $\alpha$ 1-ІІІ має можливість контролювати стан згортання та фібринолізу, синтезу та деградації біологічно активних білків, імунних реакцій, пептидів та гормонів. Формування  $\alpha$ 1-ІІІ відбувається насамперед у печінці, ентероцитах та лейкоцитах. Потім вони потрапляють у кров у разі зараження чи запалення. Під час інактивації протеїнази руйнується як протеїназа, так і  $\alpha$ 1-ІІІ [132-135].

Специфічними інгібіторами протеїнази є: ТІМП-1, ТІМП-2, ТІМП-3 та ТІМП-4, інгібітори металопротеїнази. Таким чином, протеоліз металоматричних у тканині показує загальну кількість активних ММР з врахуванням інгібування ТІМП. Існує два типи протеолізу. У першого виду, який називається повним протеолізом, відбувається повне розділення білкових молекул на окремі амінокислоти. В другому, його ще називають обмеженим протеолізом, гідроліз відбувається вибірково різних пептидних

зв'язків у молекулі білка. Другий тип протеолізу запускає багато процесів і тим самим забезпечує негайну фізіологічну реакцію організму на певні умови [134-136]

Відновлення тканин при загоєнні відбувається в 4 фази. Перша – це гемостаз, друга - коагуляція, третя – це фаза запалення, четверта - проліферація і ремоделювання. При перериванні або зупинки процесу загоєння на будь-якій стадії, відбувається порушення загоєння з утворенням хронічної рани. Для досягнення гомеостазу важливий постійний баланс між медіаторами на різних етапах загоєння. Запальна відповідь сприяє експресії факторів росту та цитокінів, які індукують модифікацію клітин та тканини, необхідні для загоєння. Всі медіатори, відомі за походженням, поділяються на два типи: гуморальні (система комплементу, система згортання та серцево-судинна система) та клітинні (клітини тканини та крові). Останні, у свою чергу, підрозділяються на попередники, а саме на ті, які присутні в клітинній та рідинній до активації (аміновазоактивні, лізосомальні фактори, нейропептиди) та ті, що виникають після активації клітин. Це такі, як метаболіти арахідонової кислоти до них відносяться: простагландини, лейкотрієни, тромбоксан A<sub>2</sub>, ліпоксини. Монокіни - ІЛ-1 $\beta$ , ФНП- $\alpha$  та ін. Лімфокіни - ФНП- $\beta$ , ФНП- $\gamma$ , ІЛ-2 та ін. Активні метаболіти кисню - супероксид, оксид водню, оксид азоту та його активні метаболіти. При ранах без ускладнень, ММП інгібуються неспецифічними інгібіторами  $\alpha$ 2-макроглобуліном та ТІМП. При складному загоєнні ран ММП не дорівнює кількості тканинних інгібіторів металопротеїнази. В результаті відбувається деградація рани - матрикс і колаген руйнуються. Надлишкові клітини, що беруть участь у запальному процесі, також змінюють профіль цитокінів у рані і переважають запальні цитокіни [131-136]

Неконтрольована активність протеїназ - один з найважливіших механізмів патології рани. У активному протеолітичному середовищі мішені протеїнази є медіаторами, які мають важливе значення для одужання.

Традиційно розвиток запалення пов'язаний із посиленням протеолізу тканин. Лізосомальні ферменти лейкоцитів відіграють важливу роль у клітинному розщепленні [129].

Під час гемостазу та коагуляції руйнуються судини, активізуються тромбоцити, починається коагуляція, стимулюються тромбоцити та речовини, що утворюють фібриновий згусток. На початку, фібрин порушується плазмоніном протеїназою, індукованою плазміногеном. Ферментативні процеси важливі на ранніх стадіях запалення, їх перебіг та завершення визначається інтенсивністю протеолізу. Запалення починається з видалення факторів росту та цитокінів з активованих тромбоцитів та пошкоджених клітин, що говорить про міграцію макрофагів до ураженої ділянки [138-140].

Нейтрофіли - це перші лейкоцити, які надходять до пошкоджуючої ділянки, де вони зв'язуються з ендотеліальними клітинами, а потім потрапляють у клітинний простір. Вони виділяють протеїнази, включаючи еластазу, які видаляють сміття/залишки з пошкоджених клітин.  $\alpha 1$ -ІІІ секретується макрофагами і регулює активність еластази. Під час запальної фази вісь калікреїн-кініну контролює вазодилатацію та судинну проникність. Полегшенню міграції нейтрофілів у позаклітинний простір сприяють протеїнази, де вони інгібують бактеріальний фагоцитоз. Такі процеси призводять до закриття рани. Після закриття рани починається фаза реконструкції, що призводить до формування колагеного рубця [140-143]

Ряд вчених проаналізували роль протизапальних та протизапальних цитокінів в активації або пригніченні протеїназ у рані, оскільки утворення сполучної тканини під час загоєння рани може залежати від цитокінів, які впливають на синтез колагену, ММП та ТІМП. Було встановлено, що при низьких рівнях ФНП- $\alpha$  вироблення фібробластів ТІМП збільшується, тоді як при більш високих концентраціях цитокіну такий синтез ускладнюється. Фракція ФНП- $\alpha$  також сприяла утворенню колагенази та стромеліну. Тому

ФНП- $\alpha$  сприяє деградації ЕЦМ за рахунок виробництва ММП та ТІМП. ІЛ-1 $\alpha$ , запальний цитокін, інгібує як вироблення ММП, так і продукцію ТІМП. Автори порівнювали рівні ММП-1 та ІЛ-1 $\alpha$  у складних та хронічних ранах. Вони встановили, що хронічне лікування пов'язане зі зниженням активності ІЛ-1 $\alpha$  та активності колагенази. Інші дослідження показали, що сигнальний шлях NF- $\kappa$ B (активованій ІЛ-1 та ФНП- $\alpha$ ) необхідний для активації транскрипції колагенази-1 (ММП-1) у кролячих фібробластах. Встановлено, що ІЛ-10, протизапальний цитокін, впливає на активність ММП; і підвищена активність ММП, в свою чергу, індукує ріст ангиогенезу через фактор росту ендотелію. Ці дослідження підкреслюють складність регуляції та модуляції ММП в рані та підкреслюючи необхідність подальшого дослідження терапевтичного гальмування ММП та непрямих шляхів, що викликають його активацію [144-148].

До рани також входять ендогенні та екзогенні ферменти з різноманітним впливом. До ендогенів належать ферменти, які вивільняються при деградації лейкоцитів та інших клітин, до екзогенних належать ферменти бактеріального походження. Специфічна дія ферментів залежить від рН середовища: активність пептази у кислому середовищі, та лужного середовища - трипептаза. Протеолітичні ферменти працюють з некротичними тканинами і призводять до розпаду білка. Максимальний ефект ферментних систем досягається тоді, коли запалення досягає свого максимуму [138-139].

Протеїнази відіграють важливу роль у складних тканинних процесах, які впливають на імунну відповідь, цілісність епітеліальних та мезенхімальних клітин, проліферацію та міграцію, дозрівання та ремоделювання ЕЦМ. Важливу роль у деградації білків відіграють цитоплазматичні ферменти. Вони регулюють клітинні процеси, включаючи внутрішньоклітинну передачу сигналів, диференціювання клітин, реплікацію ДНК, транскрипцію, каталітичні та посттрансляційні модифікації,

прогресування клітинного циклу, апоптоз та формування цитоскелету. Цитоплазматичні ферменти мають важливе значення для контролю клітинних білків, для усунення пошкоджених та непотрібних білків [129, 130]. Кальпаїн та каспази є основними протеолітичними ферментами цитоплазми. Клітини мають цитоплазматичні білкові комплекси: протеасома, яка має широкі протеолітичні функції. Протеоліз в цитоплазмі здійснюється за допомогою олігопептиду убиквітину та убіквітінової системи, АТФ та протеасоми, крім протеолітичної активності, є також АТФ-азна активність і шаперони, специфічних білків, які контролюють згорання поліпептиду та поліпептидних ланцюгів [145-147].

Система убиквітин-протеасома відповідає за деградацію більшості клітинних білків. У цій системі убиквітин лігаза показує білки, які пригнічуються присутнім поліпептидом. Ці білки визначаються 26s-протеасомою, яка складається з ядра 20s-ядра, пов'язаного з двома регулюючими субодиницями 19-s. Останні розпізнають білки і пов'язують убіквітовані білки ініціюють АТФ-залежне руйнування в каталітичному ядрі [145-147].

На першій фазі убиквітинування здійснюється активація убіквітину E1 активуючим ферментом, супроводжується гідролізом АТФ. Убіквітин зв'язується з цистеїном активної ділянки E1 і утворює тіолову зв'язок між С-кінцевим убіквітином і E1. На другій фазі активований убіквітин зв'язується з тіоловою групою ферментів-переносчика E2, який може каталізувати незалежне від кобілентного зв'язування убіквітин з цільовим білком або переносити активований убіквітин в лігазу E3. На третій фазі процесу убіквітинування між С-кінцевим залишком гліцину та лізином з'являється ізопептидна зв'язок. Цю реакцію каталізує убіквітин лігазою E3. Після взаємодії з убіквітином протеасома видаляє білки-мішені. Оскільки кожен E3 визначає специфічні білки для руйнування, існує більше 1000 лігаз що

представляють собою E3, що є основним механізмом, за яким забезпечується специфічність білкового субстрату [128-130].

Деградація субстрату відбувається в протеасомі 26s, яка складається з 60 субодиниць, що робить комплекс у 50-100 разів більшим, ніж позаклітинні протеїнази. Регулюючий компонент протеїнази 19s частини 26s протеасоми містить більше 19 компонентів, що мають різні властивості, включаючи здатність розпізнавати ланцюги поліубіквітину. Після розпізнавання 19s розчеплюють ланцюг білків з поліубіквітиновим субстратом і розгортають білок. Цей етап дозволяє транспортувати субстрат в частку 20s для деструкції білка. Події, які відбуваються у 19-річних частинок, залежать від АТФ. Протосома 20s є чотирициліндрова субодиниця, функція зовнішніх  $\alpha$ -субодиниць 20s полягає у формуванні пор, через які входять субстрати, і виходять продукти протеолізу [144-149].

Використання інгібіторів протеасомальної активності показало, що в клітинах ссавців більше половини внутрішньоклітинного білка деградується залежною від протеасоми протеїнази. Порушення в цій системі може призвести до багатьох захворювань людини. До них відносяться різні форми м'язової дистрофії, недоїдання у чоловіків, деякі форми сильної деградації, нейрогенні захворювання, порушення імунної та запальної реакції, вірусні та бактеріальні інфекції [129-131]

Ряд білків можуть бути розщеплені без попереднього убіквітинування АТФ-незалежним способом 20s протеасомою. Одне з фундаментальних структурних умов убіквітин-незалежної протеасомальної деградації - наявність неструктурованих областей у амінокислотних послідовностях білків, які взаємодіють з протеасомою. Оскільки частка протеасоми 26s становить лише 30%, а в клітинах ссавців більшість протеасоми складається у вигляді комплексів 20s, зрозуміло, що незалежний від убіквітину протеоліз виявляє процес видалення пошкоджених білків з клітини.

Шаперони – компоненти системи контролю якості клітинного протеому. В основному це білки теплового шоку (Hsp), належать до таких родин як: ATF-залежних білків (Hsp100, Hsp90, Hsp70 та Hsp60), а також до ATF-незалежних малих рівнів теплового удару (small Hsp, sHsp) [149,150].

Різні пошкоджуючі фактори спричиняють багато змін в клітинах, зміни структури і функції білків. Функції білка залежать від його укладки, яка залежить від функціонування білків теплового шоку, так званих HSPs, або білків стресу. Вони відповідають транспорт попередників органельних білків у відповідні клітинні компартменти. HSPs слугує фактором в механізмі контролю якості білків. Шаперонам властива функція - супресія цитокінів, редукція окиснювального стресу, репарація йонних каналів, участь в апоптозі і в формуванні стероїдних рецепторів, регуляція сигнальних шляхів, синтез колагену при репаративному фіброзі. Підвищений вміст HSPs впливає на стійкість до гіпоксії, активних форм кисню тощо. Також, важливо, що молекулярні шаперони, залучені до протеасомної деградації убіквітинуваних білків. Протеолітична і шаперонова системи регулюються. Таким чином, стресовий сигнал веде до транскрипційної активації генів, які кодують окремі компоненти для протеолізу і шаперонової активності. Відомо, що шаперони з пептидами допомагають презентувати і репрезентувати ендо- та екзогенні антигени в антигенпрезентивних клітинах. Таким чином, шаперони розглядають, як каталізатори автоімунних захворювань. Припускають, що шаперонів чинять патогенну дію через зміни у рівні експресії та клітинної локалізації, так і через фосфорилування та глікозування) [152-156].

Система шаперону контролює механізм деградації убіквітин-протеасомальної дії, гідроліз та усунення неправильно складених або посттрансляційно ушкоджених білків. Шаперони, розгортаючи неправильно складені або модифіковані білкові глобули, дають йому ще одну можливість добре скластись, і, якщо цього не зробити, то білок маркується убіквітином

та піддається протеолізу. Шаперони беруть участь у вивільненні білків в лізосоми для подальшої їх деградації [151-156].

Білки родини Hsp60 мають м.М. від 58 до 65 kDa. Hsp60 –це білок теплового шоку локалізований у мітохондріях, ядрі, цитозолі, на мембрані та в позаклітинному просторі. Цей білок теплового шоку приймає участь у фолдингу та транспортуванні мітохондріальних білків, також одна з його функцій - полегшення протеолітичної деградації денатурованих білків [151-156].

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

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

Опікова травма призводить до різних морфофункціональних змін у органах і системах організму, отримані зміни часто об'єднують поняттям «опікова хвороба» (ОХ). ОХ – це комплекс симптомів, а саме: виникнення функціональних та морфологічних змін, порушення обмінних процесів, нейрогуморальних процесів, розвиток опікового шоку. ОХ поділяється на періоди: перший – опіковий шок, другий - гостра опікова токсемія, третій – септикотоксемія, четвертий - реконвалесценція. За розвитку ОХ, виділяють такі механізми: перші доби - порушення мікроциркуляції, потім з десятої по п'ятнадцяту добу – інтоксикації; за реконвалесценції відбувається зворотний розвиток порушень. Треба зазначити, що найчастіше летальні наслідки спостерігається в періоді опікового шоку, пізніше -поліорганна недостатність та сепсис [ 60, 157, 178-160].

Опікова рана – це травма, яка має системні наслідки. Вона виникає під час контакту шкіри з чинниками різної природи (хімічні речовини, струмом, високої температури і т.п.). На сьогоднішній день рівень виживання після

опіків різної природи зростає, але проблема їх лікування залишається актуальною, як в медицині, біології так і для фармакології. В Україні показники захворюваності та смертності від опіків різної природи усе ще великі. Тому експериментальні дослідження з пошуку нових засобів і розробка нових технологій є важливі для одужання пацієнтів. Оскільки при опіку відбувається інтенсивний запальний процес, то головною метою при лікуванні є зниження запалення, а також важливо уникнути бактеріального потрапляння в тканини стравоходу. Важливою задачею залишається запобігання утворення рубців. На сьогоднішній день при лікуванні післяопікових уражень застосовують ряд методів. Використовують стероїдних препарати, для зменшення запального процесу. Одним з методів, щоб уникнути розширення опікової рани антирефлюксна терапія. Важливим залишається пригнічення росту бактерій, для чого використовують антибіотики. Для запобігання утворенню патологічного звуження стравоходу застосовують такі методи як розширення стравоходу (бужування), стентування. Залишається суперечливою доцільність використання антибіотиків та стероїдних препаратів [51, 60, 179-185].

На сьогоднішній день залишаються актуальним пошук методів лікування післяопікових рубцевих стриктури. Частіше післяопікові рубцеві стриктури виникають внаслідок хімічних опіків (лугами чи кислотами), рідше термічних опіків. Лікування даної патології є складним, оскільки хвороба супроводжується великою кількістю ускладнень. Також, при даній патології зустрічаються часті летальні випадки. Такі наслідки виникають внаслідок багатьох причин: особливості будови стравоходу, розташування, особливості кровопостачання, виснаження. Методи лікування на ранніх стадіях полягають у бужування у різних його модифікаціях. Повторні/часті процедури розширення можуть викликати травми слизової оболонки, виникає утворення рубців. Це відбувається внаслідок посилення проліферації фібробластів, осадження колагену. Вказані зміни можуть

викликати погіршення стриктури. Повторні/часті процедури розширення можуть викликати травми слизової оболонки, виникає утворення рубців. Це відбувається внаслідок посилення проліферації фібробластів, осадження колагену. Вказані зміни можуть викликати погіршення стриктури. При тяжких випадках – виконання пластики стравоходу. Але для дітей, такі процедури є небезпечні як у фізичному так і в психологічному плані. На сьогоднішній день немає універсальної схеми лікування, яка б допомогала уникнути всіх наслідків при даній патології [60, 138, 186-194].

В медичній практиці використовують ряд препаратів, що сприяють зниженню запалення після опіків стравоходу, це такі речовини: ібупрофен, епідермальний фактор росту, вітамін Е, метилпреднізолон, N-ацетилцистеїн, еритропоетин, дексанфенол, ретиноева кислота, диметилсульфоксид. Незважаючи на велику кількість досліджень та препаратів, виникає потреба проводити пошук та вивчення нових речовин для лікування хімічних опіків стравоходу [139, 186-194].

Сепсис та мультиорганна недостатність є однією з головних причин смертності після опіку. За опіку С-реактивний білок та лейкоцитарна формула слугують маркером запальної реакції. При даній патології тканини, які зазнали ушкодження створюють фон для бактеріального росту. Це є головними причинами для розвитку інфекції, сепсису. Сепсис є однією з головних причин смерті за опіку [140,141, 180-185].

На сьогоднішній день є ряд методів лікування післяопікових ускладнень та попередження їх. Широко використовують гелі, які мають антимікробні властивості сприяють проліферації фібробластів та ангиогенезу. Вони, як правило у своєму складі мають фактори росту фібробластів, які підвищують ефект загоєння. Також використовують -статини, вони теж володіють протизапальною дією. Популярності набули стовбурові клітини, які здані прискорювати процеси загоєння [158-169].

Таким чином, розроблено багато схем лікування та зроблені значні успіхи в медицині, але триває пошук ефективної схеми лікування за ХОС у дітей. На фармацевтичному ринку є ряд препаратів для лікування післяопікових уражень, але, в основному, вони володіють тільки антимікробною властивістю. Також є цілий ряд препаратів, які є токсичними для інтактних клітин. Тому, пошук природних нетоксичних речовин, які мають цитопротекторні властивості, є важливим [167-168].

За опіку відбуваються порушення гомеостазу між активними формами кисню та АОЗ в організмі. Відомо, що фенольні сполуки проявляють антиоксидантні властивості вони здійснюються за рахунок пригнічення утворення АФК, таким чином вони можуть нейтралізувати молекули синглетного кисню та зв'язувати йонні металів, перериваючи каскад реакцій вільних радикалів у процесі ПОЛ [166, 169-175].

Таким чином, виходячи із сучасних наукових досліджень, актуальним є розробка та вивчення речовин, що володіють комплексним впливом на різні ланки патогенезу ранового процесу та молекулярно-біохімічні механізми загоєння. З фармакологічної точки зору перспективним в цьому плані є речовини з антиоксидантними властивостями.

При аналізі сучасної літератури, ми дійшли висновку, що речовини на основі поліфенольних сполук можуть бути перспективними у використанні їх за ХОС. Нашу увагу привернув меланін, який є потужний антиоксидантом. Його властивості полягають у запобіганні деградації колагенових білків, а також він здатен посилювати мікроциркуляцію. Рядом досліджень встановлено, що ця речовина має властивості гастропротектора, також відомо, що меланін використовують при лікування стресу [169-175].

Меланіни є фенольною сполукою, завдяки наявності в його молекулі неспарених електронів він може проявляти захисні функції. Відомо, на сьогоднішній день, три класи меланінів: еумеланіни, феомеланіни, алломеланіни. Еумеланін є найбільш вивченими на сьогодні, його виявлено в

шкірі людини. Тирозин та тирозиназа, відіграють важливу роль при утворенні меланіну [169-175].

При взаємодії фенольних сполук з вільними радикалами відбувається нейтралізація вільних радикалів. Радикали фенольних сполук, які при цьому утворюються є малоактивні і не приймають участь в ланцюгу вільнорадикального перетворення. Також, радикали фенольних сполук здатні взаємодіяти з окисними радикалами, при цьому відбувається їх інактивацією. Таким чином, фенольні сполуки можна охарактеризувати як антиоксидантні [169-175].

Меланіни - це конденсовані фенольні сполуки, вони утворюються в результаті ферментативного окиснення, аутоокиснення і поліконденсації простих фенольних попередників. Існують різні форми меланіну: еумеланін - коричнево-чорний полімер дигідроксиіндола, дигідроксиіндолкарбоксилової кислоти. Відомо, що зростання синтезу меланіну стимулюється пошкодженням ДНК ультрафіолетовим випромінюванням. Таким чином, меланін здатен інгібувати перекисне окиснення. Було встановлено, що діоксифенілаланін-меланін гальмує розвиток вільнорадикальних процесів. При дослідженнях було встановлено, що присутність меланіну зменшує необхідність в активації супероксиддисмутази показано що меланін гальмує швидкість генерування супероксидних радикалів-аніонів у мембранах ендоплазматичного ретикулуму печінки [169-175].

Також було встановлено, що при моделюванні запальних процесів меланін має вплив на простагландини, лейкотрієни, також він здатен впливати на систему комплементу. Функції меланіну полягають в тому, що може впливати на інгібування запальних уражень у щурів. Тобто функції меланіну полягають не тільки в тому, що він здатен гальмувати процеси ПОЛ в мікросомальних мембранах гепатоцитів щурів, а і впливає на рівень цитокінового профілю, що проявляється в нормалізації концентрації таких цитокінінів, як ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП-альфа та лімфоцитів. Важливо зазначити, що

перераховані цитокіни відповідають за клітинний імунітет. Таким чином, меланін має антизапальні та імунномодулюючі властивості. Також є ряд експериментальних робіт, які присвячені вивченню меланіну на виразках за різних умов. Вченими було неодноразова встановлено, що меланін впливає на зменшення ерозій у слизовій оболонці шлунку викликаних різними чинниками. Експериментально встановлено, що за введення меланіну підсилюється експресія eNOS, яка в свою чергу здатна впливати на активацію захисних механізмів у клітині. Вивченню впливу гелю на основі меланіну також присвячено ряд досліджень. Встановлено, щогель на основі меланіну здатен впливати на загоєння опіку шкіри. Таким чином, меланін впливає на зниження запального процесу, тим самим впливає і на прискорення загоєння опікових ран. Експериментальні дослідження, які були присвячені вивченню розчинної форми меланіну продемонстрували, що меланін впливає на транспортну функцію. Таким чином, меланін сприяє переносу важливих метаболітів. Встановлено, що меланін здатен долати гематоенцефалогічний бар'єр, таким чином, транспортуючи речовини, які не здатні проходити через цей бар'єр самостійно [169-177].

Отже, проведений нами аналіз літератури, демонструє, що на сьогоднішній день недостатньою комплексних досліджень, які б були присвячені вивченню впливу меланіну на процеси загоєння за хімічного опіку стравоходу. Є невелика кількість робіт присвячених дослідженню впливу меланіну на зовнішні опіки, щодо внутрішніх опіків, то проведених досліджень практично не має [26-32]. Таким чином, виходячи з аналізу літературних даних випливає, що залишається важливим, як теоретичне вивчення так і практичне дослідження щодо впливу меланіну на біохімічні механізми загоєння за хімічному опіку стравоходу.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Реактиви та матеріали

Для дослідів в дисертаційній роботі використовували реактиви: каталаза, відновлений та окиснений глутатіон, супероксиддисмутаза, ортофталевий альдегід, нітросиній тетразолий (НСТ), НАДН, НАДФН, тріс-НСІ, феназинметасульфат (ФМС), нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДН), N,N'-метилен-біс-акриламід, 1-хлор-2,4-динітробензол, акриламід, L-аргінін, персульфат амонію, N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін (ТЕМЕД) (GE Healthcare АВ, Швеція), маркери молекулярної маси білків для електрофорезу, фенілметилсульфоніл фторид (ФМСФ), натрію додеацилсульфат, кумасі блакитний, тритон Х-100, Твін-20, бичачий сироватковий альбумін (БСА), Етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), протеїн А сепароза (Amersham Biosciences, АВ, Швеція)

Для визначення вмісту інтерлейкінів в крові та в клітинах слизової оболонки стравоходу були використані наступні комерційні набори: ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ , ІФН- $\gamma$ , ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-12, ММП – 1, ММП -2, ММП – 3, ММП – 8, ММП – 9, ФРФ, ТІМП-1. В роботі були використані Іg класу G виробництва фірми «Santa Cruz Biotechnology», США. Поліклональні антитіла (анти-мишинні, анти-кролячі, анти-бичачі) конюговані з пероксидазою хрому; субстрат для пероксидази хрому о-фенілендіамін (OPD) «Sigma-Aldrich», США.

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

Інші хімічні реактиви використані в дисертаційній роботі (солі, кислоти, луги) були вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче ч.д.а.

## 2.2 Обладнання

В дисертаційній роботі використані наступні марки виробників приладів та обладнання: мікропланшетний рідер виробництва фірми «BioТес», США; хроматограф «Bio Logic LP», мікроскоп Primo Star «Zeiss», спектрофотометр «Smart Spec Plus» виробництва фірми «Bio Rad», США; центрифуги CM-6M «ELMI», Allegra 64R «Beckman Coulter»; апарат для препаративного диск-електорофорезу «BioRad»; автоматичні піпетки та дозатори «Humapette». Біохімічний аналізатор «Humalyser 3000» (HUMAN, Німеччина), набір для фотометричного колориметричного визначення концентрації Albumin liquicolor (Human human GmBh- 65205 wiesbaden) виготовлені в Germany human diagnostics worldwide. Total Proteine liquicolor, Urea liquicolor, Creatinine liquicolor, GPT (ALAT) IFCC milliquiUV Humazym Test, COT (ASAT).IFCC mod. liquiUV Humazym Test, Sodium-rapid (Na<sup>+</sup>), Potassium liquirapid (K<sup>+</sup>), Chloride liquicolor (Cl<sup>-</sup>), Human human GmBh- 65205 wiesbaden).

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

### 2.3 Дотримання положень про гуманне ставлення до тварин

При плануванні та виконанні дослідів з залученням лабораторних тварин дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення досліджень відповідно до з «Загальних принципів роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986). Досліди над щурами проводили у віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка (2012 - 2018 р.). Всі дослідження над тваринами регламентувалися правилами проведення експериментальних робіт над тваринами, такі правила були затверджені вченою Радою цього закладу, які в свою чергу узгоджувались з чинним законодавством України, прийнятим на момент виконання дослідів [256].

### 2.4 Моделювання хімічного опіку стравоходу

Дослід з моделювання ХОС проводили наступним чином: лужний опік стравоходу (ЛОС) моделювали, використовуючи розчин 20% NaOH, кислотний опік стравоходу (КОС) відтворювали шляхом введення 30% трихлорооцтової кислоти (CCl<sub>3</sub>COOH). Для цього вводили зонд у стравохід запаяним кінцем і отвором на відстані 2 мм від нього. Зонд вводили на глибину 4 см від верхніх різців щура та повільно вводили 0,2 мл 20% NaOH, моделюючи зміни, що відповідають II ступеню опікового ураження. Аналогічно вводили 0,2 мл 30% CCl<sub>3</sub>COOH, моделюючи зміни, що відповідають II ступеню опікового ураження. Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій [257, 258]. Тварин виводили з експерименту на 1, 7, 15 та 21 добу від моменту

введення NaOH/CCl<sub>3</sub>COOH/вода. Вибір термінів дослідження обумовлений розвитком патоморфологічних процесів за ХОС [60, 259].

## 2.5 Умови проведення експерименту

Досліди проводилися на статевонезрілих самках щурів масою 90-110 г. Протягом досліду тварин утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до їжі. Під час всіх дослідів для данної роботи було використано 852 щура. Перед проведенням кожного з дослідів щурів розподіляли на 4 групи: 1 група інтактні щури, 2 група - щури з ЛОС, 3 група - щури з КОС, 4 група – щури з ЛОС, яким вводили меланін починаючи з 2-ї доби експерименту в дозі 1 мг/кг. Для кожної групи щурів було не менше 10.

Меланін вводили на протязі 14 діб. Для меланіну, який був використаний в досліді продуцентом були дріжжеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез.

Виведення тварин з досліду відбувалося на 1, 7, 15, 21 добу від моменту моделювання опіку розчином NaOH/ CCl<sub>3</sub>COOH або води для контрольних груп. Обрані терміни дослідження обумовлені розвитком патоморфологічних процесів за ХОС [60].

## 2.6 Отримання сироватки крові

Сироватка крові була отримана з цільної крові, яку залишали при 37° С на 4 години для вилучення фібриногену та супутніх білків. Після чого чистою сухою скляною паличкою згусток крові обережно відділяли від стінок пробірки для прискорення отримання сироватки і центрифугували впродовж 40 хв. при 2500 g. Отриману сироватку (супернатант) швидко відокремлювали від формених елементів крові та переносили в

мікропробірки з подальшим заморожуванням при  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальшого використання [260].

### **2.7 Отримання плазми крові**

Після декапітації тварин, плазму крові отримували з цільної крові. У поліетиленові пробірки з вмістом 3,8% натрію цитрату у співвідношенні 9:1 відбирали кров, після чого суміш обережно перемішували та центрифугували при  $-20^{\circ}\text{C}$  до подальшого використання. При подальшому розморожуванні перед використанням, аліквоту плазми поміщали на водяну баню за температури  $37^{\circ}\text{C}$  [260].

### **2.8 Отримання слизової оболонки стравоходу**

Для отримання слизової оболонки стравоходу, вилучений стравохід піддавався розрізу та промивці фізіологічним розчином. Зашкріб верхнього шару вносили до 3 мл буферу для тканин (10мМ тріс HCl (pH7.4) з вмістом 0,2М сахарози та 1мМ EDTA). Гомогенізація проводилася в скляних гомогенізаторах Поттера, після чого зразки піддавалися центрифугуванню при 2,5 тис.об/хв. 25 хв. Отриманий супернатант піддавався негайному заморожуванню при  $-20^{\circ}\text{C}$  задля подальшого застосування [261].

### **2.9 Визначення концентрації білка за методом Бредфорд**

Визначення концентрації білка за Бредфорд проводили згідно з стандартною методикою [262], з певними модифікаціями. 20 мкл піддослідного зразка вносили в пробірку та додавали 200 мкл стандартного реактиву за Бредфорд, повільно струшували у шейкері, після 10 хвилин інкубації вимірювали оптичну густина на спектрофотометрі.

Для побудови калібрувальної кривої використовували розчин БСА в якості стандарту, в залежності від концентрації стандарту будували графік поглинання при довжині хвилі  $\lambda$  – 595 нм.

## **2.10 Дослідження морфофункціонального стану клітин крові у щурів**

Задля дослідження показників крові щурів, цільну кров забирали в пробірку з антикоагулянтом ЕДТА. Визначали кількість еритроцитів, концентрацію гемоглобіну у крові, кількість лейкоцитів та загальну формулу крові. Використовували загальноприйняті методи [266].

### **2.10 Визначення біохімічних параметрів сироватки крові**

Дослідження біохімічних показників в сироватці крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 (HUMAN, Німеччина), при цьому використовували відповідні до інструкцій виробника тест-набори [265, 266].

#### **2.10.1 Визначення загального білка сироватки крові**

Визначення концентрації загального білка проводили фотометрично біуретовим методом. В умовах лужного середовища йонни міді взаємодіють з білками та утворюється комплекс фіолетового кольору. Концентрація білка в пробі пропорційна показнику поглинання комплексу. Спектрофотометричне дослідження проводили при довжині хвилі 546 нм [266].

### **2.10.2 Визначення концентрації альбуміну**

Визначення концентрації альбуміну проводили фотометрично, з використанням бромкрезолового, який взаємодіє з альбуміном в середовищі цитратного буферу з утворенням забарвленого комплексу. Концентрація альбуміну в пробі пропорційна показнику оптичного поглинання комплексу в пробі. Час інкубації становив 5 хв, вимірювання проводили на довжині хвилі 595 нм проти бланк – реагенту, для кожної серії досліджень використовувався один бланк реагент [266].

### **2.10.3 Визначення концентрації сечовини**

Визначення концентрації сечовини проводили за наступним методом: в присутності води та уреазі сечовина гідролізується та утворюється амоній та вуглекислий газ. За наявності гіпохлориту і саліцилату суміш забарвлюється в зелений колір в зелений колір (модифікована реакція Бертло). При пропусканні монохроматичного світла з довжиною хвилі 578 нм через розчин, показник поглинання пропорційний до вмісту сечовини у зразку. Час інкубації становив 5 хв, вимірювання проводили проти бланк-реагенту [266].

### **2.10.4 Визначення концентрації креатиніну**

Дослідження проводили за кінетичним методом без депротейнізації. В лужному середовищі креатинін в комплексі з пікриновою кислотою утворюють помаранчево-червоне забарвлення. Концентрація оптичного поглинання пропорційна показнику оптичного поглинання за довжини хвилі 490-510 нм. В якості холостої проби використовували дистильовану воду. Підтримувалася стала температура реагентів та к'ювет ( $+25 \pm 0,5$  °C) протягом всього часу дослідження [266].

### **2.10.5 Визначення концентрації йонів натрію**

Mg-уранілацетатний метод був використаний для фотометричного дослідження концентрації натрію у сироватці крові. Катіони натрію  $\text{Na}^+$  преципітуються Mg-уранілацетатом. Mg-уранілацетатний метод був використаний для фотометричного дослідження концентрації натрію у сироватці крові. Катіони натрію  $\text{Na}^+$  преципітуються Mg-уранілацетатом. Йони уранілу, котрі не преципітували з катіонами натрію утворюють жовто-кричневий комплекс з тіогліколевою кислотою. Різниця між холостою пробою (без преципітації натрію) і досліджуваною пробою пропорційна концентрації йонів натрію в пробі. Виміри проводили при довжині хвилі 405 нм, при температурі  $+20 - 25$  °C проти холостої проби, для кожної серії визначень використовувалась одна холоста проба [266].

### **2.10.6 Визначення концентрації йонів калію**

Концентрацію  $\text{K}^+$  проводили з використанням набору для фотометричного визначення зазначеного йону. Концентрацію  $\text{K}^+$  проводили з використанням набору для фотометричного визначення зазначеного йону. В безбілковому лужному середовищі катіони калію реагують з тетрафенілборатом натрію (ТРВ- $\text{Na}$ ) та утворюють дрібнодисперсну суспензію тетрафенілборату калію. Концентрація залежна від ступеню мутності суспензії. Визначення проводили за довжини хвилі 578 нм, та температури  $+20 - 25$  °C, час інкубації 15 – 30 хв. Дослідження проводили проти холостої проби (робочого реагенту), для кожної серії визначень використовувалась одна холоста проба [266].

### **2.10.7 Визначення концентрації хлоридів**

Дослідження проводили з використанням набору для колориметричного визначення концентрації хлоридів. Хлорид-йони реагують з комплексом меркурі-2,4,6-три-(2-піридил)-s-триазином (ТРТЗ) з утворенням хлориду двовалентної ртуті. ТРТЗ реагує з йоннами двовалентного заліза з утворенням забарвленого в блакитний колір комплексу. Збільшення показника оптичного поглинання комплексу при довжині хвилі 590 нм залежне до вмісту хлоридів у досліджуваній пробі. Вимірювання проводились проти Холостої проби, для кожної серії визначень необхідна одна холоста проба [266].

### **2.10.8 Визначення концентрації магнію**

Дослідження проводили з використанням спеціалізованого набору для визначення концентрації магнію. Магній здатний утворювати забарвлений комплекс із ксилідиловим синім. Забарвлення комплексу пропорційне вмісту магнію в пробі. Інкубували проби протягом 10 хв при температурі 20°C. Вимірювання проводили при довжині хвилі 530 нм, проти холостої проби, для кожної серії визначень необхідна одна холоста проба [266].

### **2.10.9 Визначення концентрації кальцію**

Дослідження концентрації кальцію проводили за наступним принципом: йони кальцію в лужному середовищі мають здатність реагувати з о-крезолфталеїном, як наслідок утворюється комплекс, оптична щільність якого залежить від концентрації кальцію у досліджуваному зразку. Визначення проводили за довжини хвилі 570-580 нм та температури +20 -

25С. Дослідження проводились проти холостої проби для кожної окремої серії визначень використовували одну холосту пробу [266].

#### **2.10.10 Визначення активності аспаратамінотрансферази (АСТ)**

Дослідження проводили з використанням набору для фотоспектрофотометричного визначення активності аспаратамінотрансферази. Вимірювання проводили при довжині хвилі 340 нм, за температури +20 - 25 °С та часу інкубації 15 – 30хв. Визначення проводилося проти холостої проби (води), інтервал становив: 1 хв [266].

#### **2.10.11 Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛаТ)**

Дослідження проводили з використанням набору для спектрофотометричного визначення активності аланінамінотрансферази. Вимірювання проводили при довжині хвилі 240 нм, за температури +20 - 25 °С та часу інкубації 15–30хв. Визначення проводилося проти холостої проби (води), інтервал часу становив: 1 хв [266].

### **2.11 Гістологічний аналіз зрізів стравоходу щурів**

Виготовлення парафінових зрізів стравоходу проводили за наступною технологією [267]. Одразу після виведення лабораторних тварин з досліду відбирали уражені ділянки стравоходу, опісля чого дані зразки фіксували на 10% буферному формаліні протягом 2 днів. Після того, як зразки тканин були зафіксовані, їх ретельно промивали впродовж 2 годин водою. Після чого проводили промивання водою протягом 10 хв. Для роботи з хлороформом зразки були проведені по розчинам спиртів з змінною концентрацією:

1.70% спирт дві зміни протягом 2 год.;

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

Отримані на попередньому етапі зразки тканин стравоходу поміщали у 96% розчин спирту з хлороформом у співвідношенні 1:1 протягом 1 год. Після чого, зразки вносили у хлороформ, розчин змінювали два рази і витримували по 20 хв для кожного разу. Після чого зразки тканин вносили у розчин хлороформу з парафіном (по 30 хв дві заміни при  $t$  37°C). На наступному етапі зразки тканин стравоходу вносили у парафін на 30 хв термін (витримували  $t$  56°C). Зразки заливали парафіном, для отримання готових блоків зразки нарізали на мікротомі, товщина зрізів складала 5 – 7 мкм. Зрізи викладали на обезжирені предметні скельця, змащені білок/гліцерином після чого складали на предметний столик.

Методом забарвлення для оцінки зрізів стравоходу був метод забарвлення за гематоксилін-еозином за стандартною методикою. Зрізи депарафінували, проводячи через спирт концентрації на спад (96%, 90%, 80%, 70% спирт по 5 хв. у кожному), після чого промивали дистильованою водою та фарбували гематоксиліном Бемера протягом 3 - 5 хв та знову промивали проточною дистильованою водою. Фарбували еозином протягом 1 - 2 хв та швидко промивали дистильованою водою, проміщаючи в спирти зі зростаючою концентрацією (70%, 80%, 90%, 96% спирт по 5 хв у кожному). Після чого просвічували бензолом (два рази по 3-5 хв.) та поміщали в канадський бальзам.

## **2.12 Визначення вмісту дієнових кон'югатів ненасичених жирних кислот**

В дисертаційній роботі, вміст дієнових кон'югатів (ДК) був визначений за наступним методом [268]. У щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера вносили аліквоту, в якій містилось 0,1 мг білка досліджуваного зразка, до цієї аліквоти – додавали 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт (співвідношенні 1:1) після чого піддавали гомогенізації протягом 10 хв. На наступному етапі проби центрифугували (1000 g, 15 хв) у пробірках з притертою пробкою. Фракцію надосаду відбирали та додавали 0,5 мл дистильованої води для розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту.

В кожену пробірку відбирали по 0,3 мл гептанової фази та додавали 1,5 мл 96% етилового спирту, після чого проби перемішували та вимірювали показник екстинкції при  $\lambda=233$  нм на спектрофотометрі. Розрахунки вмісту ДК в у пробі виконували враховуючи величини молярного коефіцієнту екстинкції при  $\lambda=233$  нм для спряжених дієнів ненасичених вищих жирних кислот, і дорівнює  $2,2 \times 10^5$  см<sup>-1</sup>М<sup>-1</sup>, виражали в умовних одиницях / мг білка. Формула для визначення ДК у пробі:

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

де А – екстинкція проб,  $\varepsilon$  - молярний коефіцієнт екстинкції при  $\lambda=233$  нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот,, С – вміст ДК, а – вміст білка в пробі, мг.

## **2.13 Визначення вмісту ТБК-активних продуктів**

При виконанні роботи, вміст ТБК-активних продуктів було досліджено згідно методу Стальної [269]. До складу проби входили зразок, в якому було 0,5 мг білка у тріс-буфері (25 мМ тріс-НСl, 175 мМ КСl, рН=7,4) до суміші

вносили 0,2 мл 17% трихлорооцтової кислоти. Центрифугували проби при 1000g 15 хв. До надосаду вносили 0,25 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти, після чого інкубували на киплячій бані 10 хв до появи забарвлення.

Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично при  $\lambda=532$  нм. Розрахунки вмісту ТБК-активних продуктів проводили враховуючи коефіцієнт екстинкції комплексу малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою за формулою:

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

де  $C$  – вміст ТБК-активних продуктів у досліджуваній пробі,  $E_{\text{досл}}$  - екстинкція проби,  $a$  – вміст білка в пробі, мг. Одиниці визначення:  $\text{нмоль} \times \text{мг}^{-1}$  білка.

## 2.14 Визначення супероксиддисмутазної активності

В дослідженні активність супероксиддисмутази визначали за методом Чеварі та інших [270]. Метод оснований на здатності супероксиддисмутази конкурувати з НСТ за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми НАДН та ФМС. Як результат, НСТ відновлюється з утворенням гідразантетразаолію, в присутності СОД відбувається зниження відсотка НСТ. До дослідної проби, яка містила 50 мкл суспензії клітин (0,5 мг білка), додавали 2 мл реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Екстинкцію проб вимірювали одразу при  $\lambda=540$  нм на спектрофотометрі. Після чого, до кожної з проб додавали 100 мкл реагенту 2 (98,5 мкМ НАДН на Тріс-ЕДТА буфері, рН=8,0), та витримували при 30°C та повторно визначали екстинкцію через 10 хвилин дотримуючись ідентичних умов .

Формула для визначення відсотку пригнічення ступеню відновлення НСТ:

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

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

## 2.15 Визначення каталазної активності

Задля визначення каталазної (КФ 1.11.1.6) активності був використаний спектрофотометричний метод, в котрому за основу взято здатність солей молібдену утворювати з пероксидом водню забарвлений стійкий комплекс [271].

У лунки планшету вносили 200 мкл 0,03% розчин пероксиду водню та додавали в лунки 10 мкл досліджуваного зразку, таким чином, запускаючи реакцію. Через 10 хв в лунки вносили 100 мкл 4% молібдату амонію для зупинки реакції. Зміну інтенсивності забарвлення вимірювали спектрофотометрично, проти холостої проби ( 10 мкл дистильованої води) при довжині хвилі 410 нм.

Каталазна активність була розрахована за наступною формулою:

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

де A – активність ферменту, мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/хв\*мг білка; E<sub>1</sub> – екстинція проби на початку інкубації; E<sub>2</sub> – екстинція проби в кінці інкубації; k – калібрувальний коефіцієнт; t – час інкубації.

## 2.16 Визначення концентрації SH-груп

Дослідження концентрації сульфгідрильних груп було проведено за методом, суть котрого полягає в тому, що при взаємодії вільних SH-груп з реактивом Елмана (5,5'-дітіобіснітробензойною кислотою) та при рН 8,0 утворюється тіонітрофенільний аніон, концентрація останнього прямо пропорційна кількості SH-груп [92]. Дослідження концентрації SH-груп було проведено спектрофотометрично, при цьому враховували коефіцієнт молярної екстинції тіонітрофенільного аніону, значення якого, при довжині хвилі 412 нм рівні  $1,14 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.17 Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону

Дослідження вмісту відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону було проведено спектрофлюориметрично, для досліду використовували ортофталевий альдегід (OPT) [273]. В результаті утворюються високофлуоресцентні продукти, котрі активуються при довжині хвилі 350 нм і характеризуються вираженим піком при 420 нм. Використовували свіжий реактив OPT у концентрації 1 мг/мл метанолу.

До 100 мкл проби додавали 1,8 мл 0,1 М фосфатного буферу, який містив 0,1 М  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 5 мМ ЕДТА, рН 8; 100 мкл ортофталевого альдегіду. Задля дослідження концентрації окисненого глутатіону використовували N-етилmaleїмід –блокатор окиснення GSH. Місткість реакційної суміші становила 100 мкл проби, 1,8 мл 0,1N NaOH та 100 мкл OPT. Після інкубації (15 хв) за кімнатної температури вимірювали інтенсивність флуоресценції при 420 нм за активації 350 нм на спектрофлюориметрі RF-1501 японського виробника Shimadzu.

## 2.18 Визначення глутатіонпероксидазної активності

Глутатіонпероксидазна активність була визначена за методом Разыграева А. [274]. Зміна активності глутатіонпероксидази базується на зменшенні вмісту GSH в реакції з 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою (ДТНБ). До 90 мкл проби вносили 890 мкл реагенту 1 (який містив GSH, азид натрію та 0,05 М трис-НСl буфер з 5 мМ ЕДТА) та 20 мкл пероксиду водню. Реакцію зупиняли додаванням 115 мкл 50% ТХО. Після чого відбувалося центрифугування при 1000g 15 х. На наступному етапі відбирали 200 мкл надосаду у пробірки з 0,1 М трис-НСl буфером, рН 8,5. Через 7,5 хв після додавання ДТНБ (4 мг/мл) визначали екстинкцію за довжини хвилі 412 нм. Холоста проба містила 0,15 М фосфатний буфер. Стандарт замість проби 0,15 М фосфатний буфер та ТХО, яку додавали відразу після внесення пероксиду водню. Активність виражали в мікромолях відновленого глутатіону на 1 г білка за хв за наступною формулою:

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

$E_k$  – екстинція контрольної проби;

$E_d$  – екстинція дослідної проби;

$E_{ст}$  – екстинція стандарту

$c$  - кількість білка у досліджуваній пробі, мг;

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

## 2.19 Визначення глутатіонтрансферазної активності

В дисертаційній роботі глутатіонтрансферазну визначали за швидкістю утворення кон'югату (з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ)), максимумом поглинання якого при довжині хвилі 346 нм [95].

Для визначення активності глутатіонтрансферази готували суміш: до 1,5 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 6,5) вносили 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону (GSH) та 0,1 мл супернатанту. Активували реакцію внесенням 0,02 мл 0,1 М ХДНБ. Зміну оптичної густини визначали протягом 3 – 5 хв при 340 нм на СФ-6305. Значення виражали в наномолях глутатіонового кон'югату на 1 г білка за хв.

Активність ферменту розраховували за наступною формулою:

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

$\Delta E$  – зміна оптичної густини за час  $t$ ;

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

1000 – коефіцієнт перерахунку мікромолей в наномолі;

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

$t$  – час інкубації, хв.

## 2.20 Визначення глутатіонредуктазної активності

Глутатіонредуктазну активність визначали за методом Власової та ін. [275], з модифікацією для вимірювання в мікрокюветі, загальний об'єм суміші складав 535мкл. Характеристикою зміни активності ферменту слугувала зміна вмісту НАДФН. Вміст реакційної суміші складав: 350 мкл фосфатного буферу (0,05 М рН 8,0); 35 мкл 1 мМ ЕДТА, 50 мкл 7,5 мМ GSSG; 50 мкл проби; 50 мкл 1,2 мМ НАДФН. Інтервал часу протягом якого визначали зміну вмісту НАДФН складав 8 хв, температура: 37 °С, довжина хвилі: 340 нм. Зміни глутатіонредуктазної активності представлені в наномолях НАДФН на 1 мг білка за хв.

Розрахунки проводили за наступною формулою:

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

$\Delta E_b$  – різниця оптичної густини між першою та останньою хвилиною замірів;

$V$  – загальний об'єм проби, мл;

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

$a$  – кількість білка, мг в мл проби;

$t$  – час інкубації, хв.

### **2.21 Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів.**

В дисертаційній роботі було визначено вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові за наступним методом преципітації в 4,5% розчині поліетиленгліколя–6000 (ПЕГ–6000). При цьому відбувалося осадження імунних комплексів 11–19s. 0,2 мл сироватки розводили в 0,1 М боратному буфері у 3 рази. На наступному етапі 0,2 мл отриманої суміші переносили у 2 мл 0,1 М боратного буфера і у 2 мл 4,5% розчину ПЕГ–6000.

Додаткової контрольної проби з ПЕГ–6000 не ставили, оскільки ПЕГ–6000 суттєво не впливає на показник світлорозсіювання. Після того, як проби ресуспендували, їх піддавали інкубації при +18–20°C впродовж 2 годин. При довжині хвилі 450 нм досліджували результати реакції [276], виміри проводили на імуноферментному аналізаторі (Titertek Multiskan, Фінляндія).

### **2.22 Визначення активності NO-синтази**

Активність NO-синтази ( $\text{Ca}^{+2}$ -залежної та  $\text{Ca}^{+2}$ -незалежної) визначали за класичним методом [277], але з сучасною та сучасною модифікацією [278], яка є пристосованою до спектрофотометричного дослідження одного з продуктів реакції – L-цитруліну.

Аліквоти грубих гомогенатів клітин інкубували впродовж 60 хв при 37 °С в загальному об'ємі 120 мкл субстратної суміші (рН=7,0), в якій містилося: 50 мкМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 мкМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мкМ  $\text{CaCl}_2$ , 4,8 мМ НАДФН, 2 мкМ L-аргінін. Зупиняли реакцію внесенням 0,3 мл 2N  $\text{HClO}_4$ . В якості холостої проби використовували повну субстратну суміш в поєднанні з попередньо денатурованим 2N  $\text{HClO}_4$  білком. Холості та піддослідні суміші центрифугували 10 хв при 3500 об/хв, а на наступному етапі в надосадовій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну за реакцією зміни кольору з антипірином.

Активність індукцйбельної NOS була аналогічна попередній але з певними відхиленнями: для дослідження активності  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість  $\text{CaCl}_2$  вносили 2 мкМ ЕДТА.

Вміст цитруліну визначали чутливим колориметричним методом [279]. Аліквоти проб (без білка) об'ємом 100 мкл, змішували з 1 мл 59 мМ діацетилмонооксиму та 1 мл 32 мМ антипірину з 55 мкМ сульфату заліза в 6N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , після чого ставили на 15 хв на водяну баню (96–100 °С) і після охолодження досліджували екстинкцію при довжині хвилі 465 нм. Вимірювання проводили проти холостої проби (100 мкл дистильованої води, 1 мл діацетилмонооксиму та 1 мл антипірину з сульфатом заліза). Будували калібрувальний графік для визначення вмісту цитруліну.

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

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

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

### **2.23 Одержання та характеристика поліклональних антитіл.**

Отриману з імунізованих тварин сироватку крові висолювали насиченим розчином сульфату амонію (кінцева концентрація - 45%). Отриманий продукт (висол) піддався центрифугуванню протягом 30 хвилин при 2000 об./хв, осад піддавався розчиненню у половині початкового об'єму 0,05 М трис-НСІ буферу (рН 7,4), після чого проводили діаліз.

Для одержання фракції антитіл з висолу супернатанту проводили хроматографію на А сефарозі. Протеїн А здатен специфічно та з високою афінністю зв'язуватися з ІgG, і цю властивість використовують задля одержання сумарних імуноглобулінів. Колонку відмивали 10X кратним об'ємом 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,4 та елюювали 100 мМ гліцин-НСІ буфером, рН 2,8. Збирали фракції по 1 мл та одразу нейтралізували 1М розчином трису до рН 7,6, та піддавали діалізу проти 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,4 впродовж ночі при температурі 4°C [280].

Вміст білків аналізували спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм (УФ-датчик хроматографа реєстрував зміни). Фракції, у який містився білок об'єднували, та ліофільно висушували. Чистоту отриманих антитіл контролювали методом диск-електрофорезу в ПААГ.

### **2.24 Метод вестерн-блотингу**

Вестерн блотинг проводили за стандартним методам, але з певними модифікаціями.

Еуглобулінову фракцію чи фракцію продуктів деградації фібрину/фібриногену після диск-електрофорезу в ПААГ, переносили протягом 1 години при 40С та силі струму 60 мА на нітроцелюлозну мембрану у 15мМ трис-НСІ буфері, рН 8,4, що містив 120 мМ гліцину та 20% метанолу. На наступному етапі забарвлювали целюлозну пластинку за

допомогою 0,1 % Ponso в 5% оцтовій кислоті. Блокували неспецифічні ділянки зв'язування інкубуюючи з 5% знежиреним молоком впродовж ночі при 4 °С. Потім відмивали 0,05 М трис-НСl буфером з 0,1% твін-20. Мембрану інкубували з первинними (певної специфічності) та вторинними (кон'югованими з лужною-фосфатазою) антитілами. На кожному з етапів проводили відмивку 0,05 М трис-НСl буфером з 0,1% твін-20 тричі по 5 хвилин. Використовували високочутливий субстрат Fast Red RC у поєднанні з лужнофосфатним субстратом Naphthol AS-TR Phosphate для знаходження поліпептидних зон [281]. Для кількісної обробки даних імуноблотингу використовували програмне забезпечення TotalLab 2.01.

## **2.25 Отримання фракції тромбоцитів**

Цільну кров кроля центрифугували (20хв за 150g, 20°C) з додаванням розчину лимоннокислого натрію (38 г/л) у співвідношенні 9:1. Потім надосадову рідину центрифугували при 300 g протягом 15 хв і температурі 20° С. Осад (з тромбоцитами, які впали в нього) суспензували у 50 мМ трис-НСl буфері рН 7,4, який містив 130 мМ NaCl та знову центрифугували за 300 g впродовж 15 хв, 20° С. Промивку тромбоцитів від залишків плазми крові проводили тричі [282].

## **2.26 Електрофорез в поліакриламідному гелі**

Електрофоретичне розділення білків проводили у поліакриламідному гелі (ПААГ) з використанням додецилсульфат натрію (ДСН) за методом Лемлі [283]. Проводили досліди з електрофоретичного розділення білків у апараті для вертикального препаративного диск-електорофорезу (BioRad) у скляних пластинах завтовшки 1 мм. Пластина містила 12% ПААГ, та 4% ПААГ для концентруючого гелю. Електродний буфер містив трис – 0,025 М,

гліцин – 0,192 М та ДСН – 0,1%. Сила струму 19 мА для концентруючого та 35 мА після проходження зразків з концентруючого в розділяючий. Після проходження електричного струму, пластини виймали та фарбували 0,125 % розчином кумасі G-250 у 25 % ізопропанолі та 10 % оцтовій кислоті. Для відмивки надлишкової фарби використовували 0,8 % оцтову кислоту.

Фотографували гелі на цифрову фотокамеру, кількісну характеристику проводили з використанням програмного забезпечення TotalLab 2.01

### **2.27 Ензим-електрофорез**

Метод ензим-електрофорезу оснований на проведенні вертикального електрофорезу у ПААГ, але ПААГ полімеризований в присутності желатину в концентрації 1 мг/мл [284]. Камеру для електрофорезу заповнювали 12% розділяючим гелем, по закінченні полімеризації якого поверх нашаровували 4% концентруючий гель. Після проходження процедури електрофорезу видаляли ДСН з гелю (промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100). Гель залишали в 0,05М тріс-НСІ буфері рН 7.4 упродовж 12 год, та забарвлювали Кумасі R-250 впродовж 40 хв. Зони протеолітичної активності ідентифікували за положенням незабарвлених плям на гелі. Для ідентифікації відповідних ділянок лізису досліджуваним ММП застосовували забарвлені маркери для електрофорезу Bio-Rad Lab (США). Обчислення електрофореграм проводили використовуючи програмне забезпечення TotalLab 2.01.

### **2.28 Хроматографія для виділення трипсиноподібних серинових протеїназ**

Трипсиноподібні серинові протеїнази виділяли за допомогою афінної хроматографії на колонці з інсулін-сефарозою (3 мл) [285]. Попередньо

колонку з сорбентом урівноважували 10 об'ємами 50 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 7,4), а в якості вихідного матеріалу на колонку наносили солюбілізовану мембранну фракцію клітин печінки (після попереднього очищення на колонці з Сефадекс G-25).

Після того, як нанесли білковий матеріал, колонку промивали 15 об'ємами 50 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 7,4), позбавляючись від матеріалу, який не зв'язався з сорбентом. Також видаляли неспецифічно зв'язаний матеріал (промивали 10 об'ємами 50 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 7,4), що містив 1 М NaCl). Буфером для елюції слугував: 50 мМ ацетатний буфер (рН 5,0), який містив 1 М NaCl та 0,1 % Тритон X-100. Збирали білкові фракції по 0,5 мл, фракції трипсиноподібних серинових протеїназ було об'єднано.

## **2.29 Визначення загальної протеолітичної активності, активності матриксних металопроїтеїназ та серинових протеїназ.**

Задля дослідження загальної активності протеїназ у зразках використовували метод визначення казеїнолітичної активності з наступними модифікаціями: 30 мкл плазми та/або 500 мкл гомогенату стравоходу доводили 0,05 М (рН 7.4) фосфатним буфером до об'єму 1 мл [286]. На наступному етапі суміш перемішували та вносили 1 мл 4% казеїну, інкубували протягом 30 хв на водяній бані при 37°C. Зупиняли реакцію додаванням 3 мл 15% ТХО з наступним центрифугуванням при 2000 об./хв. протягом 30 хв. Надосад відбирали та визначали екстинкцію при 280 нм. Холоста проба включала тільки суміші казеїну, відповідного фосфатного буфера та ТХО у ідентичних співвідношеннях.

Казеїнолітичні одиниці обчислювалися за наступною формулою:

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

Розчин казеїну використовували свіжий, 4 г казеїну розчиняли в 80 мл 0,05 М фосфатного буфера рН 7.4 і 1,6 мл 1М NaOH, та залишали при 25°C на 40 хв задля набухання, кипятили 15 хв на водяній бані. Після охолодження суміші, рН доводили до 7,4 (1 М NaOH ) та доводили об'єм до 100 мл фосфатним буфером. до реакційної суміші додавали до кінцевої концентрації 0,2М ЕДТА або 0,2М ФМСФ, для селективного визначення ММП або серинових протеїназ.

### **2.30 Визначення активності $\alpha$ 1-антитрипсину та $\alpha$ 2-макроглобуліну**

В дисертаційній роботі, активність  $\alpha$ 1-антитрипсину та  $\alpha$ 2-макроглобуліну в сироватці крові була визначена уніфікованим спектрофотометричним методом, який базується на гальмуванні гідролізу N-бензоїл-L-аргінін- етилового ефіру (БАЕЕ) [287].

У кювету спектрофотометра вносили 1,8мл тріс-НСl-буферу( рН 8,0), 0,1 мл розведеної 10 разів сироватки крові та 50 мкг у водному розчині об'ємом 0,05 мл для визначення  $\alpha$ 2-МГ. Суміш обережно перемішували та інкубували 5хв за температури 25°C, та вносили 0,1 мл розчину СІТ (300мкл). Через 5 хв вносили 1мл 1,5мм розчину БАЕЕ, суміш перемішували та визначали приріст абсорбції при довжині хвилі 253 нм протягом 10хв проти холостої проби, до складу якої входили лише реактиви. Активність  $\alpha$ 2-МГ визначали за наступною формулою:

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

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

Активність  $\alpha 1$ -АТ визначали в кюветах спектрофотометра: готували дві проби – дослідну і холосту. До складу дослідної проби входили: 1,8мл 0,05М тріс-НСІ-буфер (рН 8,0). 0,1 мл розведеної в 50 разів сироватки крові та 10 мкг трипсину у водному розчині об'ємом 0,1 мл.

Холоста проба була такого ж складу і об'єму, але вже без вмісту сироватки. До кожної з проб вносили 1мл розчину БАЕЕ, перемішували та вимірюють визначали оптичну абсорбцію при довжині хвилі 253нм проти холостої проби. Вимірювання проводили кожної хвилини протягом 4-5хв, будували графік, з лінійної ділянки якого, знаходили зміну абсорбції за 1 хв для дослідної та холостої проб. Різниця між цими величинами використовувалась для обчислення активності  $\alpha 1$ -АТ відповідно до формули:

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

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

Активність  $\alpha 1$ -АТ і  $\alpha 2$ -МГ виражали числом умовних інгібуючих одиниць (ІО) в 1мл сироватки крові. За 1 ІО приймаємо за таку кількість

сироватки крові, яка гальмувала  $\alpha 1$ -АТ або зв'язувала  $\alpha 2$ -МГ активності трипсину, так як розщеплює 1мкмоль БАЕЕ за 1хв.

### **2.31 Визначення кількості молекул середньої молекулярної маси**

Дослідження вмісту молекул низької та середньої молекулярної маси проводили за методом Габриелян [288] з модифікаціями. Метод ґрунтується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин під впливом ТХО і кількісним визначенням пептидів середньої молекулярної маси. У центрифужні пробірки вносили 1 мл сироватки ( або клітинного лізату) та 0,5 мл розчину ТХО (100 г/л), перемішували та центрифугували протягом 30 хв. при 3000 г. Відбирали по 0,5 мл супернатанту і вносили у пробірки з 4,5 мл дистильованою водою. Визначення обсорбції проводили при 254 нм. Вміст молекул середньої маси представлені в роботі в ум.од./мг білка. Кількість олігопептидів у складі молекул середньої маси визначали за рівнем білка в надосаді та представлені в мкг/мг білка.

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

Дослідження цитокінового профілю, імуноглобулінів класу G (IgG) та вмісту інсуліну у сироватці крові щурів проводили за допомогою методу імуноферментного аналізу. Дослідження проводили у 96-лункових мікропланшетах з сорбційною здатністю для розчинних білків [289].

Розведену в 10 разів (50 мМ Тріс-НСІ буфером, рН 7,4, який містив 150 мМ NaCl) сироватку або білковий матеріал слизової оболонки щурів (розведений до концентрації білка 10 мкг/мл за допомогою 50 мМ Тріс-НСІ

буфера, рН 7,4, що містив 130 мМ NaCl). Концентрацію білка визначали методом за Бредфорд.

Попередньо підготовлені зразки об'ємом 100 мкл інкубували в лунках мікропланшету при 4°C протягом ночі. Потім лунки промивали буфером (50 мМ Тріс-HCl буфер (рН 7,4) з 150 мМ NaCl та 0,05% Твін-20). Знежиреним 5% молоком блокували неспецифічні місця зв'язування (37°C, 1 год). В окремі лунки планшету (після промивки) вносили первинні анти-інсулінові кролячі антитіла, анти-IgG мишині антитіла, анти-ІФН- $\gamma$  бичачі антитіла, анти-ІЛ-1 $\beta$  бичачі антитіла, анти-ІЛ-4 мишині антитіла, анти-ІЛ-10 мишині антитіла, анти-ІЛ-12 кролячі антитіла, та інкубували 1 год при 37°C. Задля візуальної прояви зв'язування вторинних антитіл в лунки вносили 100 мкл розчину ортофенілендіаміну (ОФД) в концентрації 0,4 мг/мл, приготованому на цитратному буфері (рН 5,0) з вмістом 0,013% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а через 10 хв зупиняли пероксидазну реакцію внесенням 100 мкл 1М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та вимірювали абсорбцію при довжині хвилі 492 нм. Вміст цитокінів, IgG, інсуліну представляли в ум.од. ( перераховували на загальний вміст білка). Вміст загального білка визначали методом за Бредфорд [262].

### 2.33 Визначення протеасомної активності

Визначення активності протеасом проводили за методом розщеплення флюорогенних пептидів [290]. Каспазоподібна (КП) та хімотрипсиноподібна (ХТП) активності досліджувалися з використанням в якості субстратів наступних пептидів: Z-LLE-AMC та Suc-LLVY-AMC.

Тканину стравоходу (заморожену) гомогенізували в охолодженому 50 мМ HEPES-буфері, рН 7,5, який містив 1 мМ дитіотреїтол, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ KCl (1:3). Суміш центрифугували при 10 тис об/хв впродовж 30 хв при +4 °C.

Для визначення активності протеасом використовували супернатант.

Методика для визначення 26s протеасомної активності: до 200 мкл NEPES-буферу вносили 20 мкл надосаду та 10 мкл АТФ до кінцевої концентрації 28 мкМ для визначення ХТП активності або 14 мкМ для визначення КП активності. Для визначення 20s протеасомної активності замість АТФ вносили відповідний об'єм буферу. Для підтвердження специфічності протеасомного гідролізу використовували специфічні інгібітори протеасоми: класто-лактацистин бета-лактон (концентрація 5 мкМ та MG 132 у концентрації 5 мкМ). Реакцію запускали внесенням 10 мкл відповідного субстрату до кінцевої концентрації 18 мкМ для визначення ХТП та 45 мкМ для КП активності. Проби інкубували при температурі 37°C впродовж 30 хв. Інтенсивність флуоресценції вимірювали на (мікропланшетному рідері)  $\mu$ Quant™ (BioTek, USA) з програмним забезпеченням Gen5, дослідження проводили при довжині хвилі збудження 350 нм та емісії – 440 нм.

### ***2.34 Кількісна ЗТ-ПЛР***

#### **2.34.1 Виділення сумарної РНК з крові та тканин стравоходу щурів**

Отримання РНК проводили за методом Chomczynski [291]. У фарфорову ступку вносили 100 мг тканини та додавали невелику кількість рідкого азоту і ретельно розтирали до однорідної порошкоподібної консистенції. Після чого, в ступку вносили 1 мл суміші D (гуанідин ізотіоціанат +  $\beta$ -меркаптоетанол + лаурилсаркозинат натрію) та перемішували. До зразка додавали 100 мкл 2 М ацетату натрію та знову перемішували, після чого додавали 1 мл фенолу. Далі додавали 200 мкл суміші хлороформ:ізопропанол та ретельно перемішували. Проби лишали на льоду на 15 хв, після чого центрифугували при 10 000 g впродовж 20 хв.

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

Проби знов центрифугували за тих же умов, після чого супернатант декантували, а осад розчиняли у трикратному об'ємі суміші D і додавали до нього ізопропанол. Проби лишали на 1 год. на льоду, після чого повторювали центрифугування. Супернатант зливали, а до осаду обережно додавали відповідну кількість 70% етанолу, перемішували та центрифугували впродовж 2 хв при 13000 g. Спирт зливали, осад підсушували у витяжній шафі. Сухі осад розчиняли у 100 мкл дистильованої води та вкривали 96% етанолом.

### 2.34.2 Оцінка рівня експресії генів

Оцінку рівня експресії генів (Tgfb1, Ptgs2) здійснювали шляхом отримання кДНК на основі мРНК методом зворотної транскрипції (reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR) з наступною кількісною полімеразною ланцюговою реакцією в реальному часі (quantitative real-time PCR - qRT-PCR) з використанням комерційного набору «Verso 1-step RT-qPCR SYBR Green ROX Kit» (виробництва «Thermo Fisher Scientific», Литва).

Для проведення реакції були використані наступні пари праймерів:

- Tgfb1 - F (прямий) 5`-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC-3`  
R (зворотний) 5`-CACGATCATGTTGGACAACCTGCTCC-3`;
- Ptgs2 - F (прямий) 5`- TGCTGTTCCAACCCATGTCA-3`  
R (зворотний) 5`- TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT-3`;
- Actb - F (прямий) 5`- TGGGACGATATGGAGAAGAT-3`  
R (зворотний) 5`- ATTGCCGATAGTGATGACCT -3`;

Actb - ген  $\beta$ -актину, що експресується конститутивно, тому використаний в якості внутрішнього контролю ефективності реакції.

Оптимізована концентрація праймерів становила 0,4 мкмоль/л.

ПЛР в реальному часі проводили на ампліфікаторі Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Реакції здійснювали в об'ємі 25 мкл в стандартних 96-лункових оптичних плашках (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate). Реакційна суміш містила інтеркалюючий барвник SYBR-Green та пасивний барвник ROX, термостабільну Taq-полімеразу, дНТФ, MgCl<sub>2</sub>, ПЛР-буфер та праймери. У відповідні лунки вносилися відповідні зразки матриці НК, в лунку з NTC (no template control) – вода для ПЛР (DNase free water). Реакції проводили за наступних температурних умов:

- 95°C – 15 хв (ініціююча денатурація),
- 40 циклів з 3 температурними стадіями:
  - 95°C – 15 с (денатурація)
  - 52°C – 35 с (відпал праймерів)
  - 72° C – 30 с (елонгація);
- 72°C – 5 хв (фінальна елонгація);

із зчитуванням флуоресценції неспецифічного інтеркалюючого барвника SYBR-Green в кінці кожного циклу ампліфікації, а також побудовою кривої плавлення по завершенні реакції з метою контролю специфічності реакції за утворенням димерів праймерів.

RT-qPCR повторювали на зразках мРНК кожної тварини зкожною парою праймерів щонайменше тричі (n=9) з метою забезпечення перевірки відтворюваності результатів.

Вихідна кількість мРНК обчислювалась з використанням методу порівняння Ct (« $\Delta\Delta$ CT Method»). Ефективність ПЛР реакцій була однаковою ( $E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ ),  $\text{slope} < 0,1$ . Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до мРНК Actb.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали шляхом нормального розподілення за методом Шапіро-Вілка за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism, версія 5.04 (GraphPad Software

Inc., США). Для наступного опрацювання даних застосовували двофакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA) та пост-тест Бонферонні.

Кінцеві дані представляли у форматі «середнє арифметичне  $\pm$  середнє квадратичне відхилення» (дисперсія) – SD. Результати вважалися достовірними за умови, що  $p \leq 0,05$ .

### **2.35 Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи методи математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм Statistica 6.0, Microsoft Excel 2010, та TotalLab 2.01. Достовірними вважали відмінності при  $p < 0,05$ . Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної похибки середнього арифметичного (m) [292].

## РОЗДІЛ 3

### ХАРАКТЕРИСТИКА БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ЗА ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

#### 3.1 Метаболічні процеси за хімічного опіку стравоходу в щурів

**Відтворення в експерименті моделі хімічного опіку стравоходу.** Найбільш поширена хімічна травма – це опік стравоходу, який може виникати, як при випадковому проковтуванні речовин хімічної природи (луги, кислоти та інші хімічні сполуки). В залежності від кількості хімічної речовини та її концентрації залежить глибина опіку слизової оболонки [293].

Висока частота випадків отруєння хімічними агентами у дитячому віці на сьогодні пов'язана з результатом легкодоступності агресивних хімічних речовин у побуті. Опікові ураження стравоходу постають серйозною не тільки медичною, а й соціальною проблемою, оскільки супроводжуються важкими наслідками. Найтяжчим ускладненням є рубцевий стеноз стравоходу. Не дивлячись на широке висвітлення у вітчизняній та зарубіжній профільній літературі аспектів патогенезу, діагностики, лікування опікової травми та патологічного рубцювання, думки вчених залишаються вкрай суперечливими у визначенні підходів до вирішення цих питань [294-296].

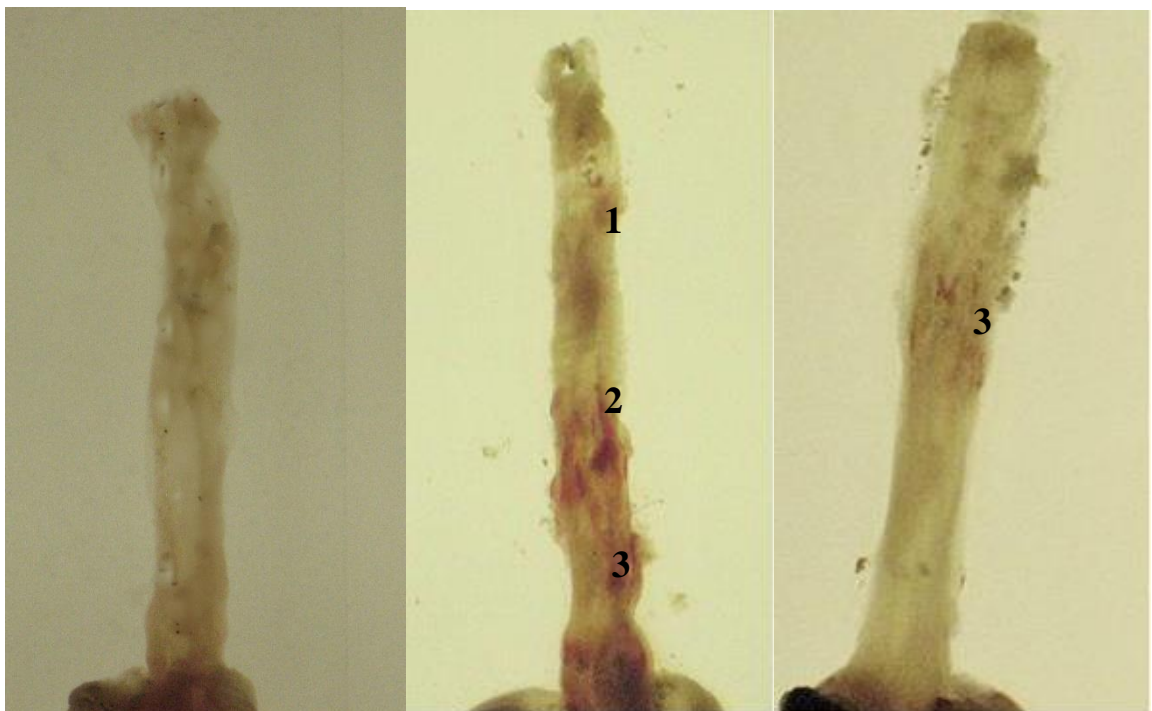
Для вивчення процесів регенерації стравоходу та проблем, які стосуються патогенезу опікової хвороби, в експерименті розроблено значну кількість моделей ХОС. Проте, наразі переважна більшість моделей ХОС, запропонованих вітчизняними та зарубіжними науковцями, була відтворена на статевозрілих тваринах. Найбільш простий спосіб моделювання ХОС на щурах був розроблений В.И. Никольским та співав., що полягає у дозованому введенні тваринам оцтової кислоти за допомогою зонду. Bautista A. та співав. запропонували застосування езофагоскопу дитячого розміру для

моделювання лужного опіку дистальної третини стравоходу у кроликів. З використанням ватного тампона, змоченого в 5% розчині натрію гідроксиду, який необхідно притиснути до стінки стравоходу. Ряд дослідників моделювали ХОС за допомогою хірургічного втручання. Такий підхід дозволяє відтворити локальний рубець на стінці стравоходу та запобігти його циркулярному характеру, однак, є дуже травматичним для піддослідних тварин [151 - 161].

Наразі вивчення проблем післяопікового процесу, регенерації тканин стравоходу та механізмів, які стосуються патогенезу опікової хвороби в експерименті залишаються відкритими. А, отже, необхідним є відтворення в експерименті моделі ХОС, що передбачатиме мінімальну травматизацію та загибель піддослідних тварин. Основними проблемами у експериментальному відтворенні опіків стравоходу є складність дозування хімічного агента, що в багатьох випадках призводить до високого відсотку летальності лабораторних тварин від шоку на перших етапах травми, а також необхідність створення обмеженого по площі опіку, що дозволить знизити загибель тварин від ускладнень на пізніх етапах експерименту. Як уже зазначалось, переважна більшість моделей ХОС, розроблених на сьогодні, відтворена на статевозрілих тваринах. Водночас, як уже згадувалось раніше, існує висока частота випадків проковтування каустичних агентів саме дітьми віком від 1 до 3 років.

Дослідивши літературні дані та сформувавши системне уявлення про склад найпоширеніших хімічних речовин та механізми їх впливу на тканини стравоходу, ми приступили до розробки нових моделей опіку стравоходу, які б адекватно відтворювали досліджувану патологію відповідно до дитячого віку. Продовження роботи у цьому напрямку надасть можливість більш детально вивчити особливості механізмів загоєння опіків стравоходу у дітей та з'ясувати причинно-наслідкові зв'язки патологічних змін з даними ураженнями.

Таким чином, ми поставили завдання змодельовати лужний та кислотний опік стравоходу, оскільки за статистичними даними вони є найбільш поширеними. Для відтворення ЛОС в якості хімічного агента було обрано натрію гідроксид. Адже багато видів побутової хімії (миючі засоби, розчини для очищення) та елементи живлення містять у своєму складі саме натрію гідроксиду (NaOH), який викликає ЛОС при пероральному потраплянні.



А) Контроль

Б) 1 доба

В) 21 доба

Рис.3.1.1 Макрофотографія стравоходу щурів. А) контроль, інтактні щури; Б) за лужного опіку стравоходу (20% NaOH) станом на 1 добу; В) за лужного опіку стравоходу (20% NaOH) станом на 21 добу.

Позначення: 1 – пошкодження епітелію верхніх шарів; 2 – крововилив; 3 – набряк.

Нами було показано, що 20% NaOH проникає в тканини та призводить до значних уражень слизової стравоходу. Макрофотографії демонструють (рис.3.1.1) пошкодження слизової оболонки стравоходу, виражений набряк, а

також крововиливи на 1 добу експерименту при моделюванні опіку з використанням 20% NaOH. На 21 добу досліджень після введення 20% NaOH спостерігали загоєння тканин стравоходу, яке відбувається за рахунок заміщення епітелію сполучною тканиною.

Для моделювання КОС в якості хімічного агента нами було обрано трихлорооцтову кислоту ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ), що є галогенованим аналогом оцтової кислоти. Вона широко використовується у сільському господарстві, у промисловості, у косметології, рідкому милі та бактерицидних засобах. У побуті дана кислота зустрічається у складі рідкого мила, бактерицидних засобів, розчинів для очищення поверхонь від жиру, плямовивідників [293, 306-307].

На рисунку 3.1.2 продемонстровано макрофотографії стравоходу щурів при експериментальному моделюванні КОС з використанням 30%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ . Нами було показано, що кислота проникає в тканини і призводить до значного ураження слизової оболонки стравоходу, порівняно з контролем (рис.3.1.1.А). Таким чином, показано набряк, гіперемію, відмічені пошкодження шарів епітелію, крововиливи в підслизовий оболонці стравоходу.

В ході експерименту було виявлено, що при моделюванні опіку стравоходу із застосуванням розчинів 20% NaOH та 30%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  пошкодження відновлюються повністю лише в 30% випадків. Місце опіку заповнює сполучна тканина, за рахунок міграції гістіоцитів і фібробластів у зону ураження. В подальші терміни досліджень залишається тільки волокна субстанції сполучної тканини, що і утворюють потім рубець.

Виявлених в ході експерименту уражень із дослідженнями стану слизової оболонки стравоходу дітей з опіком 2 ступеня показало відповідність розроблених нами експериментальних моделей (за С.Д. Терновский, 1963, і за Э.Н. Ванцян, Р.А. Тоцаков, 1991).

Однак визначити точний ступінь ураження стравоходу, навіть на основі результатів ендоскопічних досліджень, іноді буває складно. Для більш точного встановлення ступеня пошкодження потрібне визначення загальноклінічних та біохімічних показників, а також ретельне спостереження в ході лікування.

Опікова хвороба та синдром поліорганної недостатності, до якого вона призводить, є актуальною проблемою сучасної медицини. Ниркова та легенева недостатність, які найчастіше зустрічаються в структурі даного синдрому, виникають внаслідок шоккових змін та дії ендотоксинів [308].

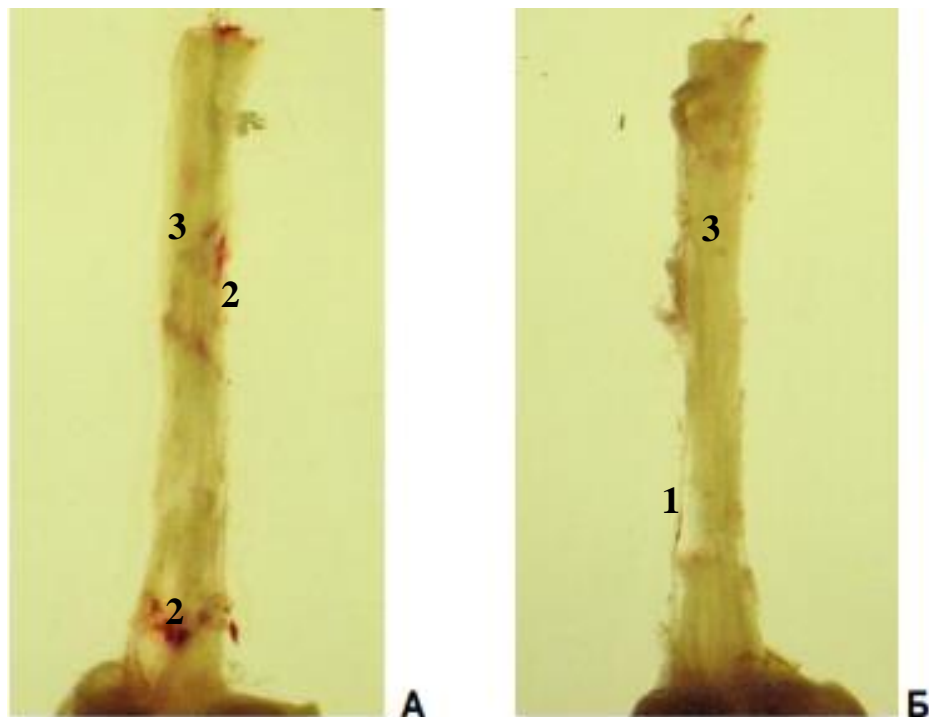


Рис.3.1.2 Макрофотографія стравоходу щурів. Б) за кислотного опіку стравоходу (30%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) станом на 1 добу; В) за кислотного опіку стравоходу (30%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) станом на 21 добу. 1 – пошкодження епітелію верхніх шарів; 2 – крововилив; 3 – набряк.

Процес загоєння зазвичай починається через три тижні після впливу ушкоджуючого агенту. Саме в цей період (перші три тижні) спостерігається найвищий рівень перфорації стравоходу. Тому рекомендовано уникати проведення ендоскопії в термін між 5 та 15 добою після виникнення опіку. Починаючи з 15 доби відбувається формування нових тканин. Процес формування нової тканини може йти від кількох місяців, до утворення стриктури. Важливо відмітити, що у процесі загоєння опікової рани також знижується тиск нижнього сфінктера стравоходу, що відповідно впливає на підвищену частоту кислотного рефлюксу, такі зміни додатково сприяють пошкодженню слизової оболонки та прискорює утворення стриктури [308-309].

**Біохімічні показники сироватки крові за хімічного опіку стравоходу.** Відомо, що ХОС супроводжується порушенням процесів обміну, такі зміни що негативно впливають на функціонування органів та організму в цілому [310]. Важливим діагностичним критерієм тяжкості опіку постають біохімічні показники сироватки крові. Тому нашим завданням було їх визначення в динаміці в експериментальних моделях ЛОС та КОС.

Відомо, що одним з критеріїв обміну білків є показники: загальний білок та альбумін [310], для подальшого дослідження було обрано саме ці показники (табл. 3.1.1).

За ЛОС концентрація загального білка в сироватці крові щурів істотно зменшувалась до 7 доби – на 36%, порівняно з контролем. Дані зміни вказують на спадання синтезу білка, інтенсифікацію катаболізму, зниження абсорбції білків та інгібування окисного фосфорилування [311]. За КОС зниження даного показника спостерігалось протягом усього досліджуваного періоду. Мінімальні значення були відмічені на 1 та 7 доби після опіку, у 1,3 раза відносно контрольного показника.

Таблиця 3.1.1

**Показники білкового обміну у сироватці крові щурів за хімічного опіку  
стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС					
Загальний білок (мг/мл)	65,01±0,81	38,21±1,01*	41,21±1,01*	60,50±0,71*	67,31±0,81*
Альбумін (мг/мл)	37,51±2,51	20,61±1,10*	23,62±1,11*	29,01±0,71*	31,01±0,82*
КОС					
Загальний білок (мг/мл)	64,81±3,11	48,61±2,33*	48,21±2,31*	51,81±2,49*	50,41±2,42*
Альбумін (мг/мл)	36,22±0,01	16,01±1,36*	21,22±2,01*	25,32±1,91*	25,51±1,01*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

Концентрація альбуміну в сироватці крові щурів за ЛОС істотно зменшувалась до 7 та 15 доби, а саме на 37% та 29% відповідно, порівняно з контролем та поступово підвищувалась до 21 доби. За КОС показник вмісту альбуміну у сироватці крові також був знижений протягом всього експерименту. Мінімальне значення спостерігали на 1 добу після опіку, у 2,3 раза нижче контрольного показника. На 7 добу концентрація альбуміну дещо вища (у 1,7 раза менше контрольного значення). Але на 21 добу досліджуваний показник все ще залишається у 1,4 раза нижче за контроль.

Отримані результати можуть свідчити про гіпопротеїнемію внаслідок інтенсифікації процесів розпаду білків за опіку, що проявляється переважно за рахунок зменшення кількості альбуміну.

В літературних джерелах зазначається, що втрата білків та рідини відбувається переважно в зоні ураження і є результатом збільшення проникності судинної стінки. Внаслідок опіку через підвищення проникності капілярів виникає набряк, що призводить до зниження внутрішньосудинного онкотичного тиску та до гіпопротеїнемії. На думку інших авторів гіпоальбумінемія корелює із виживаністю опікових пацієнтів. При цьому

обов'язково слід враховувати критерії наявності інфекцій, поліорганної недостатності, а також реакції запалення [311-315].

Відомо, що вміст альбуміну у крові тварин залежить переважно від інтенсивності його синтезу в печінці. Таким чином, гіпоальбумінемія, яку ми спостерігали, може свідчити про порушення білоксинтезуючої функції цього органу [312].

Вуглеводний та ліпідний обмін регулює печінка, тому зміна функціонального стану печінки відповідно супроводжуються порушенням обміну речовин [313]. Такі показники, як активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) (ЕС 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ) (ЕС 2.6.1.2), лужна фосфатаза (ЛФ) (ЕС 3.1.3.1), концентрація холестерину та глюкози використовують для оцінки функціонального стану печінки у крові (табл. 3.1.2).

Таблиця 3.1.2

**Показники активності печінкових ферментів у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС					
АсАТ (Од/л)	55,5±1,1	69,1±2,3*	70,1±2,3*	63,1±2,0*	56,3±1,2
АлАТ (Од/л)	27,7±0,9	64,1±2,2*	71,1±2,2*	64,1±2,3*	43,1±2,0*
ЛФ (Од/л)	354,2±3,5	500,2±1,7*	513,2±4,7*	436,2±4,0*	385,7±4,2*
КОС					
АсАТ (Од/л)	55,6±0,9	72,3±0,9*	63,2±0,9*	57,8±0,9	59,9±1,1*
АлАТ (Од/л)	28,3±1,5	79,4±0,9*	60,8±0,9*	55,7±0,9*	41,4±0,9*
ЛФ (Од/л)	354,2±5,5	550,2±0,5*	515,2±3,1*	451,2±4,0*	391,7±4,2*

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

За ЛОС було встановлено, що активність ферменту аспартатамінотрансферази зростала на 7 та 15 добу на 26% та 13% відповідно, порівняно з інтактною групою. Активність аланінамінотрансферази також зазнала змін, а саме відмічали зростання на 7, 15 та 21 добу за ЛОС на 156%, 130% та 55% відповідно. Активності ЛФ зростала на 7 добу на 45% порівняно з контрольними значеннями.

За умом опіку стравоходу важливе значення має визначення ступеня ураження печінки, ферменти АЛаТ та АСаТ слугують діагностичним маркером. Зростання активності цих ферментів пов'язане із ступенем некрозу печінки. [125]. Активність амінотрансфераз була досліджена у сироватці крові щурів за умови моделювання КОС (табл. 3.1.2). Активності АЛаТ на 1 добу за КОС зростала в 3 рази, порівняно з контролем. На 7 добу, активність спадала, але була вище за контрольні значення. Активність АЛаТ на 21 добу була в 1,6 рази вище контролю.

Досліджуючи активність ферменту АСаТ спостерігали зростання активності протягом усього експерименту. За КОС станом на 1 добу активність зростала у 1,3 рази за контроль. На 7 добу дещо знижувалась.

Таким чином зростання активності досліджуваних ферментів може бути наслідком зростання у крові ферментів, потрапивших в наслідок пошкоджених тканин за даної патології. В кінцеві терміни – на причину порушення функціонування печінки може впливати зміни кровообігу та вплив токсинів [319].

Одним з діагностичним критерієм є визначення вмісту кінцевих продуктів обміну білка, розглядають як систему залишкового азоту. Сечовина – є одним з цих показників. Вона є кінцевим продуктом обміну білків, цей показник має важливе значення при захворюванні нирок. Зростання показника може бути ознакою ниркової недостатності. Підвищення рівня креатиніну та сечовини, як зазначалось вище, у крові є

ознакою ниркової недостатності. При цьому, рівень креатиніну є більш надійним показником, оскільки зростання його концентрації у крові відбувається швидше, порівняно із рівнем сечовини. Утворення креатиніну не пов'язано з метаболізмом екзогенного білка, тоді як сечовина є основним продуктом катаболізму білків їжі [313].

Для визначення функціонального стану нирок ми досліджували показники азотистого обміну: рівень креатиніну і сечовини в сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу (табл.3.1.3). За умов ЛОС на 7 добу спостерігали збільшення концентрації сечовини на 28% та креатиніну на 65% порівняно з контролем. За КОС рівень сечовини був підвищений протягом усього терміну досліджень. Максимальне значення даного показника зафіксовано на 1 добу після опіку – у 2.2 раза вище за контроль, - що може вказувати на розвиток опікової хвороби. В подальші терміни досліджень рівень сечовини в сироватці крові поступово знижувався.

Таблиця 3.1.3

**Показники азотистого обміну у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС					
Сечовина (ммоль/л)	36,2±0,2	42,4±0,8*	46,4±0,4*	44,9±0,5*	42,1±0,8*
Креатинін (мкмоль/л)	88,1±2,1	125,1±2,1*	145,0±2,1*	120,0±2,9*	110,0±1,9*
КОС					
Сечовина (ммоль/л)	8,9±0,1	19,2±2,1*	16,7±2,1*	14,1±1,2*	13,3±0,5*
Креатинін (мкмоль/л)	88,9±0,1	151,1±1,4*	146,3±1,3*	134,1±0,8*	91,7±0,1

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

Зміна рівня сечовини у крові може свідчити про порушення функції нирок та печінки. Креатинін, сечовина це показники, які характеризують роботу нирок. Вони приймають участь у енергетичному обміні [316].

Креатинін - це компонент залишкового азоту, він є необхідною складовою при функціонуванні біоенергетичних систем. З креатиніну утворюється креатинфосфат, він слугує джерелом енергії при метаболізмі. У хворих в яких проявляється захворювання нирок відбувається з порушення фільтрації та зменшується виділення креатиніну, таким чином вміст даного показника зростає [316].

Отримані нами дані свідчать про зміни вмісту досліджуваного показника у крові за КОС. Креатинін є маркером токсичного впливу на увесь організм. За КОС ми спостерігали зростання вмісту креатиніну у крові протягом всього періоду дослідження. На 1 добу після опіку ми спостерігали максимальне зростання показника, у 1,7 раза вище за контроль.

Порушення у роботі деяких органів та процесів, які відбуваються в організмі, викликають зміни електролітичного балансу [320]. Обмін електролітів є важливою ланкою загального метаболізму, що спрямована на підтримання гомеостазу. Нами було досліджено основні катіони та аніони організму. Досліджені такі катіони, як: калій, натрій, кальцій, магній; та аніони: хлориди, фосфати (табл. 3.1.4).

За нормального фізіологічного стану розподіл іонів в клітині та поза її межами нерівномірний, що сприяє підтриманню трансмембранного потенціалу, розвиток патологічного процесу порушує цей баланс і спричиняє неспроможність клітин забезпечувати нормальний обмін речовин [315].

Калій регулює осмотичний тиск в клітині також він впливає на активність ферментів гліколізу та бере участь у метаболізмі білків. При пошкодженні тканин іони  $K^+$  поступають у кров та здатні призводити до гіперкаліємії [320].

Ми досліджували концентрацію калію у крові за КОС (табл.3.1.4). Відбувалось зростання концентрації калію у крові щурів. Станом на 1 добу показник був у 1,5 раза вище за контрольні значення, на 7 добу, поступово знижується, але є вище контролю. Станом на 21 добу концентрацію калію у 1,1 раза перевищує контрольні значення. За умов ЛОС спостерігалось збільшення концентрації  $K^+$  та  $P^+$ , порівняно з контрольними значеннями (табл.3.1.4). Так, концентрація іонів калію за ЛОС зростала на 7 та 15 добу на 48% та 27,8%, порівняно з контрольними значеннями. Концентрація іонів Р за ЛОС підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 133%, 65,8% та 38,2% відповідно, порівняно з контролем.

Вважається, що натрій в організмі відповідає осмотичний тиск, також він впливає на процеси всмоктування в ШКТ та бере участь у реабсорбції в нирках глюкози і амінокислот [321, 322].

За умов моделювання КОС визначали концентрації іонів  $Na^+$  (табл.3.1.4) у крові найбільше зростання  $Na^+$  було на 1 та 7 добу, у 1,1 раза, порівняно з контролем. На 21 добу концентрація  $Na^+$  дещо зростала. На такі зміни у крові в п після початкові терміни дослідження за умов опіку може впливати підвищена концентрація іонів  $K^+$ .

Було розглянуто ще один діагностичний показник, це рівень кальцію. Він приймає участь у багатьох процесах у організмі. Кальцій необхідний при створенні кісткової тканини також він приймає участь у роботі м'язів.  $Ca^{2+}$  важливий при обміну речовин в організмі. Нами було досліджено рівень  $Ca^{2+}$  в крові за КОС (табл.3.1.4). За моделювання КОС відзначали суттєве зниження концентрації  $Ca^{2+}$  на 1 та 15 добу у 1,8 та 1,2 раза, відповідно, нижче за контроль. Станом на 7 та 21 добу не показано достовірних змін порівняно з контролем. Результати можуть вказувати на резорбтивний ефект  $CCl_3COOH$ , вона проникає в кров, викликаючи тим самим ниркову недостатність. На рівень також може впливати порушеннями проникності речовин [322].

Магній - це біологічно активний елемент, функції магнію залежать від його здатності конкурувати за ділянки зв'язування з  $\text{Ca}^{2+}$ . Є залежність співвідношення концентрацій  $\text{Mg}^{2+}$  і  $\text{K}^+$ , це внутрішньоклітинні катіони. Відомо, що дефіцит  $\text{Mg}^{2+}$  викликає зниження вмісту  $\text{K}^+$ . Гомеостаз  $\text{Mg}^{2+}$  відбувається за рахунок змін всмоктування в ШКТ, також на його гомеостаз впливає виведення в нирках.

За умов КОС на 1 та 21 добу відбувалось зниження вмісту  $\text{Mg}^{2+}$  у 1,7 та 1,4 раза, відповідно (табл.3.1.4), на 7 та 15 добу зростав у 1,2 раза порівняно з контролем. Порушення концентрації  $\text{Mg}^{2+}$  можна пов'язати зі стресом, також на зміну концентрації впливає хронічна інтоксикація. Зростання концентрації досліджуваного показника, в проміжні терміни може бути наслідком зневоднення організму [322].

Поряд з іншими іонами аніони хлору є одними з найважливіших осмотичних агентів організму. Більша частина хлору знаходиться у позаклітинній рідині. Хлор перебуває в основному в іонізованому стані у вигляді солей  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$  [320, 322].

За КОС було виявлено зниження концентрації  $\text{Cl}^-$  на 7 добу, у 1,2 раза (табл.3.1.4). У наступні терміни - рівень хлору перебував в межах норми. За умов ЛОС концентрація  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  та  $\text{Cl}^-$  незначно знижувалась у всі терміни дослідження (табл.3.1.4). Таким чином, гіперкаліємія може бути викликана виходом калію з еритроцитів [323].

Отже, були досліджені головні діагностичні критерії тяжкості при ХОС, а саме визначенні біохімічні показники. Було встановлено, що вони корелюють з функціональним станом організму та ступенем метаболічних порушень за опіку стравоходу. Було визначено основні біохімічні показники в сироватці крові, дослідження проводили за ЛОС та КОС.

Таблиця 3.1.4

**Концентрація катіонів ( калію, натрію, кальцію та магнію) та аніонів  
(натрію, калію, магнію та кальцію у сироватці крові щурів за хімічного  
опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС					
K <sup>+</sup> (ммоль/л)	5,4±0,2	7,5±0,8*	8,0±0,8*	6,9±0,3*	5,9±0,4
Na <sup>+</sup> (ммоль/л)	156,2±1,1	150,0±1,1*	148,0±1,3*	141,0±1,5*	150,0±1,1*
Ca <sup>2+</sup> (ммоль/л)	10,6±0,3	8,9±0,1*	8,6±0,6*	8,1±0,5*	7,1±0,5
Mg <sup>2+</sup> (ммоль/л)	0,9±0,0	0,6±0,1*	0,7±0,1*	0,8±0,05*	0,8±0,1*
Cl <sup>-</sup> (ммоль/л)	110,1±1,1	88,4±0,5*	98,4±1,5*	101,8±1,3	103,6±1,4*
P <sup>+</sup> (ммоль/л)	3,9±0,3	10,3±0,1*	9,3±0,4*	6,6±0,3*	5,5±0,4*
КОС					
K <sup>+</sup> (ммоль/л)	5,5±0,1	8,5±0,2*	8,2±0,2*	6,4±0,1*	6,1±0,1*
Na <sup>+</sup> (ммоль/л)	156,1±2,6	147,1±1,9*	144,1±1,8*	149,1±1,9*	151,1±2,1
Ca <sup>2+</sup> (ммоль/л)	10,6±0,2	5,8±0,1*	10,7±0,2	8,9±0,1*	9,5±0,1
Mg <sup>2+</sup> (ммоль/л)	2,9±0,01	1,7±0,1*	3,4±0,1*	3,3±0,1*	2,1±0,1*
Cl <sup>-</sup> (ммоль/л)	110,1±2,5	105,1±1,9	95,6±1,6*	104,1±1,9*	106,1±1,9
P <sup>+</sup> (ммоль/л)	5,5±0,1	8,5±0,1*	8,2±0,2*	6,4±0,1*	6,1±0,1*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

За умов лужного та кислотного опіку спостерігали зниження концентрації загального білка та альбуміну, зростання сечовини та креатиніну, зміни в йонному обміні, та зростання активності АСТ, АЛТ. Визначені особливості метаболічних процесів у крові щурів за опіку різної етіології. Встановлені особливості свідчать про глибокі зміни у функціонуванні основних систем та органів за розвитку патологічних наслідків ураження стравоходу.

**Загально-клінічні показники сироватки крові за хімічного опіку стравоходу.** Важливим діагностичним критерієм за ХОС є визначення загально-клінічних показників у крові. Цей критерій корелює з функціональним станом організму в цілому, а також з порушеннями метаболізму за умов хімічного опіку.

Були досліджені такі показники: гемоглобін, еритроцити, лейкоцити, моноцити, еозинофіли, базофіли, нейтрофіли (табл.3.1.5). Ці показники були обрані для оцінки метаболічних змін за ХОС [309].

За хімічного опіку стравоходу вміст гемоглобіну достовірно підвищувався станом на 7 добу. В подальшому спостерігали тенденцію до зниження рівню гемоглобіну. Станом на 21 добу концентрація показника була нижче контрольних значень. Вміст еритроцитів за опіку стравоходу був знижений протягом всього експерименту. На 21 добу вміст еритроцитів та гемоглобіну знижується. Таким чином, розвивається анемія, яка виникає в результаті розпаду еритроцитів. Подібні зміни також відбуваються внаслідок кровотечі після відторгнення струпа за опікової хвороби [310, 311].

За опіку стравоходу вміст лейкоцитів перевищував норму протягом усіх термінів дослідження. Лейкоцити ділять на зернисті: еозинофіли, базофіли, нейтрофіли. Також лейкоцити є незернисті: моноцити і лімфоцити. Таким чином, за опіку рівень лімфоцитів був підвищена на 1, 15 та 21 добу після опіку. Підвищення вмісту лейкоцитів є наслідком опіку та крововтрат [311].

За хімічного опіку стравоходу концентрація моноцитів зростала проти контрольних значень. Концентрація паличкоядерних нейтрофілів спочатку була в межах норми, а на 21 добу цей показник зростав в той період, коли рівень сегментоядерних нейтрофілів знижувався порівняно з контрольною групою.

Таблиця 3.1.5

**Загальноклінічні показники крові щурів за хімічних опіків  
стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС					
Гемоглобін (Hb) (г/л)	148,1 ±4,3	155,1±0,1	126,1±3,7*	126,1±3,7*	135,1±3,9*
Еритроцити (ER) (*10 <sup>6</sup> /мм <sup>3</sup> )	7,1±0,2	5,1±0,1*	4,5±0,1*	4,5±0,1*	4,5±0,1*
Лейкоцити (WBC) (*10 <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	1,4±0,1	5,1±0,1*	6,9±0,2*	7,1±0,2*	8,1±0,2*
Лімфоцити (%)	32,1±0,9	62,6±2,7*	47,1±1,4	64,1±1,9	64,1±1,9
Моноцити (МО) (%)	3,5±0,1	6,7±0,9*	7,5±0,2	9,1±0,3	10,1±0,3
Еозинофіли (ЕО) (%)	2,1±0,1	1,0±0,1	0	1,1±0,1	1,1±0,1
Базофіли (ВА) (%)	0,3±0,0	0	0	1,0±0,1	0
Паличкоядерні нейтрофіли (%)	2,1±0,1	1,7±0,4	1,1±0,1	4,3±0,1	3,5±0,1
Сегментоядерні нейтрофіли (%)	60,2±1,3	28,1±1,1*	54,1±1,2	31,1±1,1*	29,0±1,1*
Гемоглобін (Hb) (г/л)	148,1 ±4,3	155,1±0,1	126,1±3,7*	126,1±3,7*	135,0±3,9*
КОС					
Гемоглобін (Hb)(г/л)	148,1 ±1,3	155,1±0,1	178,1±0,1*	151,1±0,1	133,1±1,2*
Еритроцити (ER) (*10 <sup>6</sup> /мм <sup>3</sup> )	7,1±0,1	5,1±0,1*	5,9±0,1*	5,6±0,1*	5,4±0,1*
Лейкоцити (WBC)(*10 <sup>3</sup> /мм <sup>3</sup> )	1,3±0,1	5,1±0,1*	3,8±0,1*	6,2±0,1*	7,1±0,1*
Лімфоцити (%)	32,1±1,5	62,6±2,7*	31,5±1,4	59,4±2,6*	59,7±2,6*
Моноцити (МО) (%)	3,5±0,7	6,7±0,9*	13,1±0,6*	7,1±0,9*	6,1±0,1*
Еозинофіли (ЕО) (%)	2,1±0,3	1,1±0,1	0	1,1±0,1	1,1±0,1
Базофіли (ВА) (%)	0,3±0,1	0	0	0	0,3±0,1
Паличкоядерні нейтрофіли (%)	2,1±0,3	1,7±0,4	1,5±0,3	1,5±0,3	4,0±0,4*
Сегментоядерні нейтрофіли (%)	60,2±1,3	28,0±1,1*	54,0±1,2	31,0±1,1*	29,1±1,1*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

Лімфоцити це важливі клітинні елементи імунної системи, головна функція їх полягає в розпізнаванні чужорідного антигену та участі у імунній відповіді організму [312].

Моноцити поглинають зруйновані тканини, очищують і оновлюють кров. За хімічного опіку станом на 1, 7 та 15 добу ми спостерігали зростання моноцитів, що також може бути компенсаторною відповіддю.

Зменшення нейтрофілів за опіку є наслідком руйнування тканин та розвитком запалення. Нейтрофіли діляться на: мієлоцити, паличкоядерні, сегментоядерні. За умов опіку стравоходу станом на 21 добу відбувалось зростання паличкоядерних, та зниження сегментоядерних нейтрофілів. Зростання нейтрофілів є захисною реакцією організму від інфекцій та запалення. Нейтрофільоз, який ми спостерігали є зсувом паличкоядерних нейтрофілів та відповідає бактеріальних інфекції [311, 312].

В ході досліджень нами були встановлені особливості зрушень основних метаболічних процесів в організмі щурів за умов кислотного та лужного опіку слизової оболонки стравоходу. За обох типів ХОС відбувалось зростання лейкоцитів, зниження еритроцитів.

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.

### **3.2 Запальний процес за хімічного опіку стравоходу щурів.**

При опіку виділяється велика кількість медіаторів запалення, запускається запальний процес, зростає рівень прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1. Останні активують синтез в тканинах ММП 1, 3, 2, 9, які, в свою чергу, інгібують ТІМП1. На тлі порушення балансу між синтезом ММП і ТІМП1 підвищується рівень ФНП-а, що впливає на синтез цитокінового профілю і сприяє повторному розвитку запального процесу.

За ХОС спостерігається АФК, що було досліджено раніше. Встановлено, що вільні радикали викликають активацію транскрипційних

факторів AP-1 та NF- $\kappa$ B. Вони контролюють секрецію сигнальних молекул, а саме: цитокінів, хемокінів та факторів росту.

Відомо, що в організмі за умов опіку відбувається запальна реакція, а саме відбувається викид цитокінів. Інтенсивність реакції залежить від багатьох факторів: площі, глибини ураження, характеру інфекційного агента [324, 325].

В період ранньої і пізньої токсемії погіршується транспортування кисню до тканин. Тяжка і тривала гіпоксія тканин призводить до активації в ендотеліальних клітинах синтезу медіаторів запалення та мітогенних молекул. Цитокіни активують адгезію нейтрофілів, відомо, що вони також ініціюють проліферацію. В цей час лейкоцити починають активуватись, тим самим вивільнюючи вільні радикали та протеїнази, які в свою чергу, руйнують біологічні молекули. Інтерлейкіни впливають на більшість клітин, які приймають участь у розвитку запалення. Це такі клітини, як: макрофаги, фібробласти, гранулоцити, клітини ендотелію й епітелію, Т- і В-лімфоцити. За опікової хвороби велике значення мають цитокіни. При тяжкої форми опіку цитокіни потрапляють у кров, такі зміни призводить до важкого стану всього організму [326, 327].

Нами було досліджено рівень прозапальних інтерлейкінів (ІФ- $\gamma$ , ІЛ-6, ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, ФНП- $\alpha$ ) в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу (табл.3.2.1.). Прозапальні інтерлейкіни активують проліферацію Т- і В-лімфоцитів. Впливають на продуктивність антитіл, а також здатні підсилювати синтез адгезивних молекул та впливають на синтез білків гострої фази. Прозапальні інтерлейкінів приймають участь у реалізації імунітету специфічного та неспецифічного [329]

Нашими дослідженнями було встановлено, що за ЛОС відбувалось достовірне зростання рівню прозапальних цитокінів на 7 добу експерименту. Такі зміни вказують на складність патологічного процесу. В кінцеві терміни дослідження зміни рівня цитокінів були різнонаправлені.

ІЛ-1 $\beta$  є одним з ключових цитокінів, який характеризує рановий процес. За ЛОС рівень ІЛ-1 $\beta$  у сироватці крові був підвищеним, в порівнянні з показником у тварин контрольної групи. Спостерігали підвищення показника на 7 та 15 добу на 18% та 25% відповідно, порівняно з інтактними тваринами. Рівень ІЛ-1 $\beta$  у слизовій стравоходу зростав на 7 добу на 30%, на 15 та 21 доби спостерігали зниження порівняно з контролем (таб. 3.2.1).

Таблиця 3.2.1

**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

У сироватці крові рівень ІЛ-1 $\beta$  при моделюванні КОС перевищував контрольні значення протягом усіх термінів дослідження. Максимальний показник спостерігали на 1 добу, у 1,35 раза. На 21 добу рівень ІЛ-1 $\beta$  наближався до контрольних значень. Таким чином, дані які ми отримали підтверджуються літературними, і вказують на активацію запального

процесу у щурів за ХОС. Такі зміни характеризуються зростанням вмісту ІЛ-1 $\beta$ . Відомо про стимулюючий вплив ІЛ-1 на метаболізм сполучної тканини. Дослідний інтерлейкін активує проліферацію фібробластів тим самим збільшуючи продукцію цілого ряду інтерлейкінів, простагландинів та ростових факторів. Відомий той факт, що під впливом ІЛ-1 у сполучній підсилюється синтез колагену, при тому стають активними деякі ферментів. Внаслідок таких змін відбувається утворення келоїдних рубців. Формування рубців, пов'язує з утворенням гранульованої тканини, яка зростає під впливом високих концентрацій ІЛ-1 $\beta$  [330, 331].

Дослідження рівня ІЛ-12 за умов моделювання КОС виявили максимальне підвищення показника у 1,4 раза також на 7 добу після травми. На 15 та 21 добу даний показник дещо знижувався, але залишався достовірно вище контролю в середньому у 1,3 раза. ІЛ-12 є ключовим цитокіном для посилення імунної відповіді.

Продуцентами його служать нейтрофіли, моноцити, макрофаги та лімфоцити. Індукторами є мікробні компоненти. Клітинами-мішенями ІЛ виступають природні кілери і Т-лімфоцити. ІЛ-12 має функцію активувати диференціювання Т-лімфоцитів, тим самим підвищуючи цитотоксичну активність [325].

ФНП- $\alpha$  виконує важливу функцію у розвитку запального процесу, стимулює проліферацію Т- і В-лімфоцитів. Також відомо, що ФНП- $\alpha$  впливає на продукцію антитіл, здатен активувати синтез адгезивних молекул. Фактор некрозу посилює синтез білків гострої фази та бере участь в реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [323]. Нами було показано, що рівень ФНП- $\alpha$  в сироватці крові щурів при модулюванні ЛОС на 7, 15 та 21 добу достовірно не відрізнявся від контрольних значень. ІФН- $\gamma$  і ФНП- $\alpha$  мають виражену імуномодулюючу дію, є індукторами клітинної ланки імунітету і відносяться до основних прозапальних цитокінів.

Нами було показано підвищення рівня ІФН- $\gamma$  в сироватці крові щурів за умов ЛОС на 7 добу експерименту на 18%, порівняно з контролем (рис. 3.2.1). В тканинах стравоходу при моделюванні ЛОС рівень дослідженого інтерлейкіну зазнавав незначного зростання.

Рівень ІФН- $\gamma$  та ФНП- $\alpha$  в сироватці крові щурів за КОС на 1 добу перевищував контроль у 1,3 раза. На 15 та 21 добу даний показник був у 1,1 раза вище за контроль.

Т-лімфоцити, CD4 + приймають участь в продукції ІФН- $\gamma$ . Відновлення кількості і функціональної активності Т-лімфоцитів є одним з механізмів підвищення концентрації ІФН- $\gamma$  в сироватці. Також на рівень ІФН- $\gamma$  впливає зміна рівня ендогенної інтоксикації.

Деякі дослідники включають в критерії несприятливого прогнозу при сепсисі і також зростання концентрації ІЛ-6. В ході наших досліджень було показано підвищення рівню ІЛ-6 за умов ХОС. Одним з чинників зростання ІЛ-6 за опіку є зниження рівня ІЛ-4, таким чином, ІЛ-4 можна використовувати, як прогностичний фактор при появі ускладнень [325, 333].

Протизапальні цитокіни (ІЛ-4, ІЛ-10) впливають на регуляцію специфічних імунних реакції та здатні обмежувати розвиток запальної реакції. Нами було досліджено рівень протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) у слизовій оболонці стравоходу за хімічного опіку стравоходу (рис. 3.2.2).

ІЛ-4 та ІЛ-10 можуть виступати антагоністами прозапальних цитокінів і мають здатність знижувати їх активність. Протизапальні цитокіни знижують проліферацію і відповідь Т-лімфоцитів на антигени також здатні знижувати рівень ІЛ-1, ФНП- $\alpha$  зменшуючи, таким чином, запальні прояви [330, 335].

За умов ЛОС нами було встановлено достовірне зниження рівня протизапального цитокіну ІЛ-4 в сироватці крові станом на 7 добу на 11,2% порівняно з контрольними значеннями, на 15 та 21 добу концентрація ІЛ-4 перевищувала контроль на 10% та 18% відповідно. При дослідженні слизової

стравоходу нами було відмічено зниження рівня цитокіну на 7, 15 та 21 добу на 26%, 18%, 11% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. За умов КОС було встановлено достовірне зниження рівня ІЛ-4 на 1, 15 та 21 добу дослідження в середньому в 1,1 - 1,2 раза, порівняно з контролем. Одним критерії пошкодження при сепсисі є зниження концентрації ІЛ-4 [330, 335].

Таблиця 3.2.2

**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

Визначення вмісту ІЛ-10 у сироватці крові статевонезрілих щурів за ЛОС не виявило достовірних змін, порівняно з контрольними значеннями. В тканинах стравоходу концентрація ІЛ-10 знижувалась на 7 добу на 35% порівняно з контролем. За КОС рівень ІЛ-10 у сироватці крові статевонезрілих щурів був різнонаправлений. Спостерігали зростання

концентрації показника на 7 добу у 1,2 раза, та зниження на 1, 15 та 21 добу в 1,2 та 1,1 раза.

Протизапальні цитокіни, які синтезуються клітинами TH2 і TH3, виступають антагоністами прозапальних цитокінів і мають здатність знижувати їх активність. Вони здатні знижувати процеси проліферації і відповідь Т-лімфоцитів на антигени. Також вони здатні впливати та знижувати продукцію ІЛ-1, ФНП- $\alpha$ , оксиду азоту і простагландинів. Таким чином вони зменшують запальні прояви [330, 325, 339, 340].

Таким чином, концентрацію деяких цитокінів у крові за опіку розглядається як порушенням патофізіологічної ланки. А також, такі зміни можуть вказувати та розвитку поліорганної недостатності. Рядом дослідників встановлена прогностична ролі високої концентрації ІЛ-10 саме в період токсемії. Таким чином, підвищений рівень ІЛ-10 деякі дослідники пов'язують з високим ризиком септичних ускладнень [325, 326, 339, 338].

ЦіК - комплекси, які складаються з антигена, антитіл і пов'язаних з ними компонентів комплементу. Утворені ЦіК взаємодіють практично з усіма клітинами крові, а також зовнішніми рецепторами клітин багатьох органів і тканин. У нормі ЦіК можуть знаходитися у вільному циркулюючому та зв'язаному стані, в подальшому вони деградуються фагоцитами. Однак, надмірне накопичення ЦіК у кров'яному руслі може бути обумовлено переважанням швидкості їх утворення над швидкістю елімінації, дефіцитом одного чи декількох компонентів комплементу або функціональними дефектами фагоцитарної системи. За умов довготривалого циркулювання ЦіК можуть відкладатися в судинах і тканинах, ушкоджуючи їх, зокрема, шляхом гіперактивації фагоцитів. Визначення рівня ЦіК в сироватці – важливий маркер для оцінки захворювання, особливо при аутоімунних хворобах [339].

Також рівень ЦіК у крові є індикатором імунного статусу організму. За умов розвитку імунокомплексного процесу має значення розмір імунних

комплексів. Досліджено, що найбільш руйнівним є комплекси середнього і малого розміру. Так, високомолекулярні імунні комплекси можуть бути фагоцитовані або розчинені комплементом, тоді як низькомолекулярні (утворені при надлишку антигену) не активують комплемент, слабо фагоцитуються, а відтак – тривало циркулюють у крові та фіксуються в тканинах. Існують дані, які свідчать, що підвищення рівня імунних комплексів корелює з погіршенням стану хворих [339]. Визначення рівня імунних комплексів є інформативним показником за умов опікової хвороби, разом з тим проблеми, пов'язані з обґрунтуванням доцільності визначення вмісту ЦК за умов ХОС ще не отримали однозначного вирішення.

Нами було досліджено вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу. За експериментальної моделі ЛОС найвищими були показники середньомолекулярних ЦК - в 1,3 раза більше за контроль, що вказує на запальний процес у даній групі.

Також спостерігалось підвищення рівня низькомолекулярних ЦК у тварин за ЛОС - у 1,5 раза, порівняно з контролем. Отже, відмічено суттєві зсуви у молекулярному складі імунних комплексів, що проявлялися, насамперед, у підвищенні концентрації найбільш токсигенних середньо- та низькомолекулярних ЦК. При дослідженні вмісту високомолекулярних ЦК на 21-шу добу у тварин, яким індукували опік стравоходу, не спостерігали достовірних змін. Показники середньомолекулярних та низькомолекулярних ЦК у тварин, яким моделювали ЛОС, на 21 добу були вищими за контроль, але нижчими за показники на 1 добу експерименту. Таким чином, тривале накопичення ЦК може бути провідним фактором пошкодження тканин та пов'язано з розвитком імунокомплексних патологічних процесів.

За умов моделювання кислотного опіку спостерігалась тенденція до збільшення рівня високомолекулярних, середньомолекулярних та низькомолекулярних ЦК в середньому у 1,3 - 1,4 раза станом на 1 добу порівняно з показниками інтактного контролю (табл. 3.2.3.).

На 21 добу після КОС рівень високомолекулярних та середньомолекулярних ЦІК дещо знизився, проте залишався вищим за контроль. Водночас рівень низькомолекулярних ЦІК на 21 добу дослідження за КОС все ще істотно перевищував контроль – у 1,3 раза.

Таблиця 3.2.3

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

Показник	Групи щурів з ХОС		
	Контроль	1 доба	21 доба
ЛОС			
Високомолекулярні ЦІК	0,10±0,01	0,12±0,02	0,11±0,02
Середньомолекулярні ЦІК	0,14±0,01	0,19±0,01*	0,18±0,02*
Низькомолекулярні ЦІК	0,12±0,01	0,18±0,04*	0,15±0,04
КОС			
Високомолекулярні ЦІК	0,10±0,01	0,13±0,01*	0,11±0,01
Середньомолекулярні ЦІК	0,14±0,01	0,18±0,02*	0,16±0,02*
Низькомолекулярні ЦІК	0,12±0,01	0,17±0,01*	0,15±0,01*

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

Відомо, що тривала циркуляція в організмі ЦІК та зростання їх концентрації може призводити до накопичення останніх в тканинах. Надмірна кількість бактерій призводить до зростання рівня ЦІК у крові. За інфікування в організмі з'являється велика кількість збудників, на що виробляються антитіла такі зміни призводять до появи ЦІК. Внаслідок чого, печінката селезінка не здатні виводити токсини з організму і концентрація ЦІК зростає [341-343].

При сепсисі за запальних реакціях рівень ЦІК зростає. При запаленнях роль ЦІК є в їх здатності активувати гуморальні фактори імунної системи. Такі зміни, в свою чергу, сприяють тому, що формується захисна реакція або патологічний процес [205]. Екзогенні та ендогенні антигени сприяють утворенню ЦІК. Імунні комплекси які циркулюють за нормальних умов вивільняють С3b комплекс, що в свою чергу впливає на зв'язування імунного комплексу з рецепторами Fc і сприяє видаленню ЦІК ретикулоендотеліальною системою, при порушенні цього процесу накопичуються в тканинах органів, При депонуванні ЦІК в органах відбувається руйнування тканини. [341, 345].

Отже, за умов опіку виділяється велика кількість медіаторів запалення, які активують запальний процес, що сприяє підвищенню вмісту прозапальних цитокінів при дефіциті протизапальних цитокінів. В ході досліджень нами було встановлено підвищення рівня прозапальних цитокінів та зниження протизапальних цитокінів, що супроводжувалося підвищенням вмісту середньо- та низькомолекулярних ЦІК. Такі зміни цитокінового профілю, співпадають з активацією протеолізу та свідчать про уповільнення загоєння опікової рани.

### **3.3 Оксидативний стрес за хімічного опіку стравоходу щурів**

Ступінь прояву патологічних реакцій з боку різних органів, а також результат захворювання залежать від тяжкості опікової травми, віку пацієнта, своєчасності та правильності проведеної терапії потерпілого. Нейтрофіли, що надходять до опікової рани, продукують у великій кількості активні форми кисню, які на тлі зниження активності антиоксидантних ферментів викликають пошкодження мембрани клітин. Це додатково уповільнює процес загоєння опікової рани [218, 346].

Істотну роль відіграє і надмірна активація процесів ПОЛ. В результаті інтенсифікації вільнорадикальних процесів та послаблення антиоксидантного захисту (АОЗ) накопичуються значні кількості токсичних продуктів, що викликають серйозні порушення метаболізму і призводять до розвитку окислювального стресу [346].

Встановлено, що надмірна активація перекисного окиснення призводить до пошкодження мембран та зниження каталітичної активності ферментів. За опіків відбувається порушення рівноваги між продукцією активних форм кисню та активністю та антиоксидантними системами захисту в організмі. Антиоксидантна активність фенольних сполук опосередковується з одного боку пригніченням утворення активних форм кисню, а з іншого – здатністю нейтралізувати вже наявні молекули синглетного кисню. Фенольні сполуки зв'язують іони металів, які виступають каталізаторами реакцій утворення активних форм кисню, блокуючи таким чином каскад вільнорадикальних процесів ПОЛ [169, 320, 322,].

ПОЛ пов'язують з обміном білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, та ін. Тому наступним етапом наших досліджень було дослідити особливості ПОЛ, Нами визначено рівень первинних продуктів ДК, вторинних – ТБК-активних продуктів у сироватці крові і слизовій оболонці щурів в експериментальній моделі ХОС (табл. 3.3.1).

Результати дослідження показали, підвищення вмісту продуктів ПОЛ за ХОС. Показником утворення первинних продуктів реакцій вільнорадикального окиснення ліпідів є вміст ДК. За умов ЛОС спостерігалось збільшення вмісту ДК у сироватці крові на 21 добу в 6,5 раза, порівняно з контролем. В тканинах стравоходу концентрація ДК підвищувалася за ЛОС протягом всього експерименту, максимальні значення спостерігалися на 21 добу експерименту показник в 6,9 раза перевищував контроль.

Таблиця 3.3.1

**Відносний вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m, n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові						
Дієнові кон'югати, %	ЛОС	100,00±4,48	318,27±15,79*	346,13±15,79*	487,00±17,34*	655,73±20,74*
	КОС		260,00±15,22*	268,96±17,61*	337,31±21,79*	401,49±17,91*
Слизова оболонка стравоходу						
Дієнові кон'югати, %	ЛОС	100,00±7,18	183,08±11,28	242,56±18,46*	265,64±34,36*	181,54±10,77*
	КОС		216,92±18,46*	190,26±14,87*	182,05±11,79*	105,13±15,38

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

Результати дослідження показали, підвищення вмісту продуктів ПОЛ за ХОС. Показником утворення первинних продуктів реакцій вільнорадикального окиснення ліпідів є вміст ДК. За умов ЛОС спостерігалось збільшення вмісту ДК у сироватці крові на 21 добу в 6,5 раза, порівняно з контролем. В тканинах стравоходу концентрація ДК підвищувалася за ЛОС протягом всього експерименту, максимальні значення спостерігалися на 21 добу експерименту показник в 6,9 раза перевищував контроль.

За умов КОС вміст ДК зростав як у слизовій оболонці стравоходу, так і у сироватці крові. Станом на 15 добу даний показник у крові зростав у 1,6 раза порівняно з контролем. У слизовій на 1 добу відбувалось зростання у 2,2 раза вище за контроль. Станом на 21 добу відбувалось незначне зниження ДК порівняно з контрольною групою. Описані зміни можуть бути наслідком накопичення вторинних та кінцевих продуктів ПОЛ.

Малоновий диальдигід є вторинними продуктами ПОЛ. Він з'являється у наслідок за розриву подвійних зв'язків, які відбуваються у вуглецевому скелеті окиснюваних молекул. Нами було досліджено вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (табл.3.3.2). Було показано, що за умов хімічного опіку стравоходу відбувається зростання рівня ТБК-активних продуктів як у слизовій оболонці стравоходу, так і у крові .

Таблиця 3.3.2

**Відносний вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові						
ТБК-активні продукти, %	ЛОС	100,00±3,13	115,95±3,13	130,20±5,13*	153,85±6,55*	139,60±5,98*
	КОС		116,95±2,35*	175,67±1,47*	200,94±1,73*	177,39±1,62*
Слизова оболонка стравоходу						
ТБК-активні продукти, %	ЛОС	100,00±1,96	319,89±2,50*	304,17±2,90*	230,55±3,49*	125,49±3,19*
	КОС		201,16±2,70*	259,44±4,72*	230,64±3,95*	212,43±5,30*

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

Так, за умов ЛОС концентрація ТБК-активних продуктів в сироватці достовірно зростала. Станом на 21 добу концентрація досліджуваного показника підвищувалась в 1,4 раза порівняно з контролем. При дослідженні ТБК-активних продуктів в слизовій стравоходу, спостерігали подібні зміни. На 7 та 15 добу Вміст продуктів значно перевищував контроль, порівняно з контролем – у 3 та 2,3 раза відповідно.

Так, за умов ЛОС концентрація ТБК-активних продуктів в сироватці крові щурів впродовж всього експерименту була достовірно підвищена. На 21 добу концентрація підвищувалась в 1,4 раза за ЛОС порівняно з контрольними значенням. Подібні результати були отримані для слизової стравоходу. Вміст ТБК-активних продуктів значно перевищував контроль на 7 та 15 добу за ЛОС, порівняно з контролем – у 3 та 2,3 раза відповідно.

За умов КОС вміст досліджуваного показника у слизовій оболонці стравоходу на 7 добу після опіку був вищий за контроль у 2,6 раза, а у сироватці крові на 15 добу після опіку у 2 рази. В кінцеві терміни дослідження за КОС рівень ТБК-активних продуктів залишається вищим за контроль - у 2,3 раза у слизовій стравоходу та у 1,8 раза у сироватці крові.

Отримані нами дані свідчать про те, що за даної експериментальної моделі активація процесів ПОЛ відбувається вже протягом першої доби після травми. Подальше посилення окисних процесів свідчить про прогресування опікової хвороби.

Шифові основи – це кінцеві продукти ПОЛ, вони з'являються у результаті полімеризації ліпідів, білків. Було досліджено вміст шифових основ у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу (таблиця 3.3.3). Встановлено поступове зростання вмісту шифових основ за КОС На 21 добу після опіку даний показник перевищував контроль як у сироватці крові, так і у слизовій стравоходу в середньому в 1,2 раза.

Шифові основи виступають маркерами порушення гомеостазу. Таким чином, підвищення рівню ШО розглядають, як наслідком активації ПОЛ.

Дані які ми отримали за КОС, вказують на те, що відбувається активація процесів вільнорадикального окиснення. Що, в свою чергу, впливає на порушення функцій плазматичної мембрани. Ненасичені жирні кислоти впливають на процеси ПОЛ, такі зміни впливають на підвищення вмісту ДК, малонового диальдегіду, шифових основ. Відомо, що продукти

перекисного окиснення впливають на пригнічення проліферації. Такі зміни можуть бути причиною зниження регенерації слизової за КОС.

Таблиця 3.3.3

**Відносний вміст шифових основ у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
Шифові основи, %	100,00 $\pm$ 3,98	102,49 $\pm$ 3,98	104,98 $\pm$ 3,98	106,47 $\pm$ 4,48	124,88 $\pm$ 5,47*
Слизова оболонка стравоходу					
Шифові основи, %	100,00 $\pm$ 4,05	106,31 $\pm$ 4,05	114,41 $\pm$ 4,95*	118,02 $\pm$ 4,95*	122,52 $\pm$ 4,95*

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

Активація процесів ПОЛ у слизовій приводить до пошкодження мембранних структури. Основою мембран є ліпідний бішар, тому окиснення яке викликається вільними радикалами, є однією з причин порушення і пошкодження мембрани. Відповідно, деградація ліпідів мембрани призводить до збільшення проникності мембрани до іонів. Такі зміни призводять до порушення клітинного гомеостазу. Продукти перекисного окиснення є токсичними агентами, а вільні радикали пошкоджують такі біологічні молекули: нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи [130, 131].

Відомо, що за норми процеси вільнорадикального окиснення (ВРО) відіграють важливу роль у функціонуванні біологічних систем. ВРО бере участь у регулюванні метаболізму в клітині. Поряд з цим, ВРО є механізмом ушкодження клітин за дії різних чинників. Надмірна їх активація може стимулювати їх проліферацію тим самим сприяти ушкодженню клітині. При значних порушеннях в організмі спостерігають накопичення продуктів ПОЛ.

За опікової хвороби збільшується продукція АФК, що призводить до пошкодження тканин, порушення рівноваги вільнорадикальними процесами і активності АОС. До формування оксидативного стресу призводить порушення нормального перебігу окиснювальних процесів. [349, 350, 351].

За умов ХОС досліджували антиоксидантний захист у крові та слизовій стравоходу. Досліджували такі компоненти АОС як активність каталази (ЕС 1.11.1.6) та супероксиддисмутази (СОД) (ЕС 1.15.1.1) (табл.3.3.4).

СОД це фермент, який входить до групи антиоксидантних ферментів. Він захищає організм від дії кисневих радикалів. Досліджуваний фермент здатен каталізувати дисмутацію супероксиду, в кисень і перекис водню. Зниження активності СОД може призвести до накопичення супероксид-аніон-радикалу, який ініціює ланцюг вільнорадикальних реакцій у клітині [351].

Таблиця 3.3.4

**Відносна активність супероксиддисмутази (СОД) у сироватці крові та слизовій оболонці щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові						
СОД, %	ЛОС	100,00±6,67	46,67±6,67*	56,67±6,67*	53,33±6,67*	80,00±6,67*
	КОС		30,77±3,85*	23,08±3,85*	42,31±3,85*	73,08±3,85*
Слизова оболонка стравоходу						
СОД, %	ЛОС	100,00±6,24	122,87±4,16*	108,32±6,24	66,74±2,08*	52,18±4,16*
	КОС		98,09±4,46	96,82±4,46	90,45±3,82*	64,97±3,18*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

У ході досліджень було показано, що за ЛОС у сироватці крові активність СОД знижувалась на 7 та 15 добу, до 45%, порівняно з контро.

При дослідженні слизової, за опіку стравоходу спостерігали на 7 добу зростання активності СОД. Дані зміни можна пояснити включенням компенсаторної відповіді на вироблення надмірної кількості АФК. Станом на 15 та 21 добу спостерігали зниження досліджуваного показника до 48% за умов ЛОС 48% за ЛОС, порівняно з контрольними значеннями.

При КОС було показано, що на 1 та 7 добу супероксиддисмутазна активність у сироватці крові знижувалась у 3,3 та 4,3 раза, відповідно. На 15 та 21 добу активність ферменту дещо зростала, але показники залишались нижче контрольних у 2,4 та 1,4 раза, відповідно. У слизовій оболонці стравоходу було показано поступове зменшення активності СОД. Найбільше зниження активності СОД відбувалось на 21 добу після опіку, у 1,5 раза нижче за контрольну групу.

Нами була досліджена активність каталази у сироватці крові та слизовій оболонці шурів за хімічного опіку стравоходу (табл. 3.3.5). Визначення активності даного показника дозволило встановити, що у тварин за ХОС у сироватці крові та слизовій оболонці, активність була різнонаправлена

В ході дослідження було встановлено, що за ЛОС активність каталази зростала, в сироватці крові найвищі показники були на 15 добу, з 21 доби спостерігали поступове зниження. У тканинах стравоходу найбільш висока активність каталази була виявлена на 1, 7 та 15 доби - перевищувала контроль в 1,5 - 2,5 раза порівняно з контрольними значеннями.

За КОС визначали активність каталази, показано, що як у крові, так і у слизовій стравоходу активність ферменту знижувалась порівняно з контрольною групою. Станом на 7 добу активність каталази знижувалась, як у сироватці крові, так і у слизовій стравоходу, у 1,8 та 1,6 раза, відповідно порівняно з контролем. На 15 добу відбувалось зростання показника. На 21 добу за опіку стравоходу каталазна активність була у 1,5 раза нижче за контроль у сироватці крові, а у слизовій стравоходу – у 1,1 раза.

Таблиця 3.3.5

**Відносна активність каталази у сироватці крові та слизовій оболонці щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові						
Каталаза, %	ЛОС	100,00±6,67	133,33±16,67*	200,00±16,67*	266,67±10,00*	233,33±13,33*
	КОС		58,78±2,69*	55,52±2,55*	62,89±2,69*	66,71±2,97*
Слизова оболонка стравоходу						
Каталаза, %	ЛОС	100,00±18,18	627,27±18,18*	600,00±45,45*	472,73±36,36*	236,36±45,45
	КОС		73,22±3,28*	62,02±2,73*	81,15±3,55*	87,70±3,83*

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

Досліджуючи каталазну активність у крові і слизовій стравоходу ми встановили, що у тварин за кислотного опіку активність ферменту була нижчою за контрольні показники. На 7 добу активність каталази знижувалась у 1,8 та 1,6 раза, у крові і у слизовій, порівняно з контролем. Станом на 15 добу активність зростала. За умов КОС активність каталази знижувалась на 21 добу у 1,5 раза у крові, у слизовій – в 1,1 раза. Порівняно з контролем.

Виявлені зміни СОД та каталази за умов ХОС може бути наслідком вільнорадикального окиснення, що впливає на утворення супероксиду, та зростання вмісту пероксиду водню.

Таким чином, при опіку стравоходу на тлі підвищеної активності процесів ПОЛ (про що свідчить зростання вмісту ДК, ТБК-активні продуктів) спостерігали зниження механізмів АОЗ (що проявлялось в спаді активності СОД). За ХОС відбувалось порушення балансу між дією прооксидантних факторів і АОС під впливом активації вільнорадикальних процесів.

Підвищене утворення вільних радикалів і зростання процесів ПОЛ призводить до змін властивостей біологічних мембран та функціонування клітин. Наслідком ПОЛ є окиснення тіолових груп, яке відбувається в

мембранних білках. Такі зміни впливають на появу дефектів в ліпідному шарі мембран. Нами було досліджено вміст SH-груп у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу (табл.3.3.6).

Таблиця 3.3.6

**Відносний вміст SH-груп у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові						
SH-групи, %	КОС	100,00±4,00	100,00±4,00	80,00±3,33*	73,33±2,67*	60,00±2,67*
Слизова оболонка стравоходу						
SH-групи, %	КОС	100,00±4,55*	77,27±4,55*	27,27±0,91*	13,64±0,45*	9,09±0,45*

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

За КОС у слизовій оболонці стравоходу спостерігали зниження вмісту білкових SH-груп, порівняно з контрольними значеннями. Станом на 21 добу, відбувалось зниження у 1,1 рази вмісту SH-груп порівняно з контролем. У крові рівень показника знижувався на 7 та на 21 доби у 1,6 раза порівно з інтактними щурами. Отже, за хімічного опіку у слизовій вміст SH-груп значно змінювався. Такі зміни можуть бути пов'язані з порушеннями у АОС та вказувати на пошкодження білків, амінокислот, пуринових і піримідинових основ, РНК, ДНК [137].

Глутатіоновій системі належить велика роль у захисті клітин від оксидативного стресу, порушення її функціонування призводять до змін у процесах проліферації та апоптозу [353].

Нами було досліджено вміст відновленого (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу (табл. 3.3.7).

Таблиця 3.3.7

**Відносний вміст відновленого глутатіону (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу (M±m, n=8),**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
GSH	100,00±4,05	101,57±5,00	87,42±5,51	80,72±5,74*	69,50±4,40*
GSSG	100,00±4,66	95,25±7,00	117,17±4,00*	121,06±5,06*	146,38±4,88*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

За опіку стравоходу вміст GSH на 7 добу мав тенденцію до зниження, на 21 добу показник у 1,4 раза був нижче за контроль. Такий ефект може бути зумовленим пригнічення чи послаблення АОЗ, також можна пояснити виключенням окиснення чи відновлення глутатіоном SH-груп білків. На зниження відновленого глутатіону може впливати зниження активності глутатіонредуктази, яка, як відомо, здатна відновлювати GSSG до GSH. [33]. Таким чином, отримані дані відповідають літературним, які вказують, що за опіку спостерігається зниження рівня GSH [354].

За опіку стравоходу вміст окисненого глутатіону GSSG підвищувався починаючи з 7 доби. Станом на 21 добу вміст даного показника, у 1,5 раза був вище за контроль. Зниження вмісту відновленого глутатіону при збільшенні вмісту окисненого глутатіону може вказувати на розвиток окисного стресу. Окисний стрес, в свою чергу, виникає від генерації вільних радикалів.

За КОС нами було досліджено активність ферментів глутатіонової системи: глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГПО), глутатіонтрансферази (ГТ) у сироватці крові щурів за КОС. (табл.3.3.8)

Таблиця 3.3.8

**Відносна активність ферментів глутатіонової системи у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ),**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Глутатіонредуктазна, %	100,00±4,00	94,84±4,50	85,25±6,00	77,88±4,00*	74,44±3,00*
Глутатіонпероксидазна, %	100,00±4,70	75,97±5,00*	68,80±3,66*	69,67±4,74*	71,42±7,55*
Глутатіонтрансферазна, %	100,00±4,88	96,51±3,10	62,65±4,05*	53,72±5,04*	45,02±3,00*

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

При дослідженні активності глутатіонредуктази було відмічено зниження даного показника на 7 добу за КОС. Станом на 21 добу зниження активності було у 1,3 раза за контрольні значення. Зниження активності глутатіонредуктазної може бути обумовлено зниження вмісту НАДН та НАДФ.

Досліджуючи глутатіонпероксидазну активність за умов опіку стравоходу було встановлено зниження активності у сироватці крові вже на 1 добу і залишалась майже незмінною протягом наступних і продовжувала поступово зменшуватись протягом наступних термінів дослідження. У середньому активність глутатіонпероксидази знижувалась у 1,4 раза нижче контролю. Зниження активності глутатіонпероксидази може відігравати головну роль у зростанні процесів ліпопероксидації. Відомо, що накопичення продуктів ліпопероксидації, може призвести до патологічних наслідків [354].

Потрібно також відмітити, що зміни активності антиоксидантних ферментів визначаються інтенсивністю утворення активних форм кисню, зокрема, помірне підвищення АФК викликає активацію ферментативної ланки АОС, тоді як надмірне збільшення вільних радикалів, навпаки, пригнічує ферментативну ланку ОАС захисту клітин.

Вважають, що в умовах стресу активність антиоксидантних ферментів знижується. Таким чином, можна припустити, що зниження глутатіонпероксидазної активності відбувалося на тлі суттєвого пошкодження клітин стравоходу [355, 357].

Однією з функцій глутатіонпероксидази є відновлення пероксиду водню та органічних гідроперекисів, також може запобігати накопичення вторинних продуктів пероксидації. Глутатіонтрансфераза шляхом кон'югації з GSH здатна метаболізувати вторинні метаболіти [356].

Станом на 7 добу за КОС нами було досліджено глутатіонтрансферазну активність. Спостерігали зниження ферменту, зміни можуть бути викликані надлишком токсичних метаболітів кисню, які з'являються за розвитку запального процесу. Станом на 21 добу відбувалось зниження у 2,2 раза порівняно з контрольними значеннями.

Глутатіонтрансфераза чутлива до відновленого глутатіону, і таким чином зниження відновленого глутатіону може вплинути на зменшення активності ГТ за опіку стравоходу. Таким чином, ми дослідили функціонування ферментів глутатіонової системи за КОС. Встановлено зниження активності глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази. Встановлені зміни можуть вказувати на розвиток хронічного стану за опіку стравоходу [358-360].

Таким чином, нами було встановлено, що за опіку відбувається активація вільнорадикальних процесів при порушенні механізмів АОЗ, ці зміни були обумовлені зниженням активності СОД, каталази та рівнем глутатіону. Спостерігали порушення активності індукцибельної NO-синтази,

що може призводити до активізації транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B і чином впливати на більшість цитокінів. Було показано, що NO здатне з супероксидним радикалом впливати на утворенням пероксинітриду [359, 361].

Показано, що за умов хімічного опіку стравоходу відбуваються процеси вільнорадикального окиснення. Ці процеси впливають на утворення АФК та порушення функціонування АО ферментів. Відмічено порушення у плазматичній мембранній, та її компонентів, що впливає на зростання продуктів ПОЛ. Встановлено, що процеси вільнорадикального окиснення та механізми АОЗ впливають на зменшення активності СОД, каталази призводять до порушення в глутатіоновій системі за ХОС.

Результати вказують на порушення в метаболічній системі за опіку стравоходу, які викликані зростанням АФК, що служить передумовою для активації протеолізу.

Опік не тільки викликає збільшення синтезу активних форм кисню, але також послаблює АО механізми захисту. Такі зміни у хворих за умов опіку призводять до АФК- опосередкованого пошкодження клітинної ДНК [357].

Досліджуючи механізми запалення за ХОС зрозуміло, що однією з ланок патогенезу є синтез окису азоту (NO) - це міжклітинна сигнальна молекула, що приймає участь у процесах загоєння, вона приймає активну участь у регуляції тонуусу судин, гальмуванні агрегації тромбоцитів та їх адгезії на стінках судин, регуляції синаптичної передачі нервового імпульсу, активації або пригнічення активності багатьох білків та ферментів. NO приймає роль у опосередкуванні гострих запальних реакцій. NO - має АО ефект, реалізується завдяки витісненню супероксиду, який є основним компонентом окисного стресу[137, 362].

NO з епітеліальних і нейрональних клітин здатне контролювати кровоостачання, секрецію ШКТ. Ендогенна NO з'являється у клітинах з L-аргініну, це протікає за допомогою фермента синтаза оксиду азоту (NOS) (EC

1.14.13.39), NOS існує в 3х ізоформах: перша та друга - конститутивна (NOS I та NOS III), третя - індукцйбельна (NOS II). Нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДФ), флавінмононуклеотид (ФМН), флавінаденіндинуклеотид (ФАД) та кальцій-кальмодулін це ті компоненти, які є важливим для синтезу NO [363-365].

nNOS - експресується в нейронах периферійної та центральної нервової системи, а також в тромбоцитах, мозковому шарі наднирників. eNOS – є в ендотелії, ендотелії судин мікроциркуляторного русла ШКТ [366, 367].

cNOS - є в цитоплазмі, а активність її залежить від концентрації кальцію та кальмодуліну. Вільний кальцій впливає на інактивацію цього ферменту. cNOS виконує регуляторну роль. На nNOS, iNOS, mNOS кальцій не впливає, вони індукується під патогенним впливом цитокінів [369, 370].

За умов ЛОС визначено активність eNOS та iNOS у крові та слизовій оболонці стравоходу (табл. 3.3.9., 3.3.10.)

Таблиця 3.3.8

**Активність eNOS (ум.о/мг білка\*хв) у сироватці крові щурів за лужного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові				
eNOS, ум.од/мг*хв	0,57±0,01	0,67±0,02*	0,92±0,05*	0,62±0,05
Слизова оболонка стравоходу				
eNOS, ум.од/мг*хв	0,94±0,02	1,31±0,05*	1,44±0,08*	1,02±0,09

\*- p<0,05 порівняно з контролем

В крові на 7 та 15 добу активність eNOS за умов ЛОС зростала на 19% та 55% відповідно, порівняно з контрольними показниками. На 21 добу спостерігали зниження до контрольних значень.

В слизовій була схожа тенденція, на 7 та 15 добу відбувалось зростання на 35% та 60% відповідно, порівняно з контролем.

В крові на 7 та 15 добу активність eNOS за умов ЛОС зростала на 19% та 55% відповідно, порівняно з контрольними показниками. На 21 добу спостерігали зниження до контрольних значень.

В слизовій була схожа тенденція, на 7 та 15 добу відбувалось зростання на 35% та 60% відповідно, порівняно з контролем.

За умов ЛОС визначено активність iNOS у крові та слизовій оболонці стравоходу (табл. 3.3.9.). У крові активність iNOS за умов ЛОС зростала на 7, 15 та 21 добу на 24%, 44% та 21% відповідно, порівняно з інтактними щурами.

Таблиця 3.3.10

**Активність eNOS (ум.о/мг білка\*хв) у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Групи щурів з ХОС			
	Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові				
iNOS, ум.од/мг*хв	0,65±0,03	0,81±0,03*	0,95±0,06*	0,09±0,04*
Слизова оболонка стравоходу				
iNOS, ум.од/мг*хв	0,88±0,04	1,44±0,05*	1,56±0,09*	1,51±0,07*

\*- p<0,05 порівняно з контролем

В слизовій активність iNOS за ЛОС підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 63%, 70% та 51% відповідно, порівняно з контролем.

Нами було встановлено, що за ХОС відбувається зростання активності iNOS та eNOS. Дані зміни вказують на негативні наслідки за хімічного опіку. NO у великих концентраціях викликає токсичний ефект на клітини. Пероксинітрит (ONOO-) – це сильний окиснювач, який здатен порушувати структуру мембран у клітинах, та чинить негативний вплив на енергетичний обмін [144].

Таким чином, при опіку стравоходу на тлі підвищеної активності процесів ПОЛ (ДК, ТБК-активні продуктів) спостерігали пригнічення механізму АОЗ (активність СОД). За умов опікової хвороби розвивається порушення балансу між дією прооксидантних факторів і антиоксидантною системою за рахунок активації вільнорадикальних процесів.

Отже, виявлені 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 ХОС.

## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРИСТИКИ СИСТЕМИ ПРОТЕОЛІЗУ ЗА ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

#### 4.1 Протеолітичний баланс сироватки/плазми крові за хімічного опіку стравоходу

Загоєння являє собою процес, що супроводжується складними динамічними змінами біохімічних та імунологічних показників. Він реалізується завдяки складній мережі взаємозв'язків між численними медіаторами, взаємодії між клітинами і позаклітинним матриксом, що призводить до запуску регенеративних процесів [370].

Загоєння ран передбачає етапи запалення, збільшення грануляційної тканини та реепітеліалізації. Фази формування грануляційної тканини і реепітелізації включають інфільтрацію макрофагів, формування грануляційної тканини через утворення нових кровоносних капілярів, проліферацію фібробластів і перетворення позаклітинного матриксу. На пізніх стадіях загоєння, грануляційна тканина змінюється на рубцеву тканину в результаті поглинання ексудату і активації синтезу колагену. Процес загоєння залежить від індивідуальних особливостей організму і масштабів опіку та може тривати від кількох тижнів до кількох місяців. Синтез позаклітинного матриксу і колагену залежить від активності процесу протеолізу та інгібіторів. При порушенні балансу між ферментом та інгібітором може протікати патологічне загоєння, що супроводжується виникненням хронічних ран чи надмірним рубцюванням [372]. У зв'язку з цим доцільним є дослідження процесів протеолізу за умов ХОС.

Протеоліз вважається особливою формою біологічного контролю. Його активними учасниками є протеїнази, які виконують різні функції і керують практично всіма біологічними процесами, які відбуваються на

молекулярному клітинному, тканинному і органному рівні. Протеолітичні ферменти реалізують свою регуляторну функцію двома способами: повний і обмежений протеоліз. Повний протеоліз – це деградація, руйнування пошкоджених білків. Обмежений протеоліз вважається універсальним механізмом для синтезу, інактивації та модифікації гормонів, ферментів та інших фізіологічно активних речовин. Надмірна інтенсифікація протеолізу за деяких патологічних станів відіграє важливу роль у патогенезі запалення, алергічних реакцій, кровотечах, а також є одним з факторів, які сприяють злоякісному росту [373,374].

Реакції протеолізу відіграють ключову роль не тільки в регуляції внутрішньоклітинного метаболізму білків, але і в цілому ряді процесів всередині та поза клітиною, утворенні активних ферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Надмірна активність протеолітичних ферментів обмежується інгібіторами. Активовані ферменти, як правило, є активаторами інших білків, таким чином створюючи складні та багатокомпонентні етапи активації, які регулюють більшість найважливіших метаболічних шляхів. Порушення активаторно-інгібіторного балансу будь-якої ланки таких каскадів неминуче вплине на функціонування суміжних систем і організму в цілому, тому власне лежить в основі багатьох патологій на молекулярному рівні для багатьох патологій [375].

За опіку протікає тривалий запальний процес із високою протеолітичною активністю, що сприяє хронізації рани. Велика кількість нейтрофілів, які виділяють желатинази та еластази, що призводить до надмірної деградації та інактивації факторів росту. Хоча роль дисбалансу системи інгібіторів протеїнази у розвитку опіків та ускладнень після опіку активно досліджується, даних недостатньо [375, 377].

Ролі протеолітичних процесів в організмі людини при патогенезі різних захворювань в останні роки приділяється все більше уваги. Протеолітичні ферменти можуть руйнувати всі компоненти позаклітинного матриксу

тканин і судин, а рівень крові регулюється складною системою білка-інгібітора [376-378].

Функціонування ММП при загоєнні нормальних та патологічних ран активно досліджується [380, 383]. У той же час недостатньо експериментальних та клінічних даних про роль ММП в загоєнні опікових ран стравоходу. Визначено вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 в сироватці крові в умовах лужних та кислих опіків (табл. 4.1.1).

Таблиця 4.1.1

**Вміст матриксних металопротеїназ (ум.од/мл) 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				
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±0,8	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

ММП-1 (інтестинальна колагеназа, фібробластів та колагеназа I) синтезується фібробластами, хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, ендотеліальними клітинами та остеобластами. Синтез ММП-1 стимулюється декількома агентами, включаючи цитокіни (наприклад, епідермальний фактор росту, ІЛ та ФНП- $\alpha$ ). ММП-1 бере участь у деградації колагенових ниток у процесі ремоделювання ЕЦМ. Після травми ММП-1 виражається базальними кератиноцитами дистальних ділянок епідермісу різних видів опікових травм (інфекційні рани, хронічні виразки, післяопераційні рани) [384].

ММП-2 (желатинази) експресуються насамперед у клітинах мезенхіми фібробластів у період розвитку та регенерації тканин. Вони також синтезуються нейтрофілами, макрофагами та моноцитами. ММП-2 разом з ММП-9 беруть участь у деградації колагену четвертого типу, основного компонента базальних мембран та желатину. ММП-2 також можуть знищувати інші типи колагену (V, VII і X), еластин і фібронектин. Крім того, за даними деяких авторів ММП-2 та ММП-3 залучені у процесах загоєння опікових ран [385, 386].

За умов моделювання ЛОС нами було показано підвищення вмісту ММП-1 та ММП-2 в сироватці крові експериментальних тварин на 21 добу експерименту в 1,2 та 1,3 рази, порівняно з контрольними значеннями.

За умов КОС рівень ММП-1 у сироватці крові збільшився вже на 1 добу дослідження, перевищивши контроль в 1,3 рази. У наступні періоди рівень ММП-1 поступово знижувався, але залишався вище показника в контролі. Вміст ММП-2 збільшився на 1,8 порівняно з контрольними значеннями на 1 і 15 добу після КОС.

ММП-3 сприяє деградації багатьох компонентів сполучної тканини. До компонентів тканини входять протеоглікани, колаген типу два, чотири, дев'ять, одинадцять та ламінін і фібронектин. Крім того ММП-3 також може впливати на порушення позаклітинного матриксу шляхом активації

протеоколлагенази-1, а також здатна активувати інші ММП, такі як ММП-3, ММП-7 та ММП-9. Таким чином, ММП-3 може вважатись одним з найважливіших учасників відновлення сполучної тканини. Даний фермент може відігравати вагомую роль у загоєнні ран, атеросклерозі та утворенні пухлинних клітин [387].

За умов ЛОС було показано зростання концентрації ММП-3 в сироватці крові, максимально – на 7 та 21 добу, в 1,3 раза, порівняно з контролем. За КОС не було виявлено достовірних змін, на 21 добу дослідження концентрація ММП-3 у плазмі перевищувала контроль в 1,1 раза.

ММП-8 (нейтропільна колагеназа) є неактивним проферментом в поліспецифічних гранулах морфноядерних лейкоцитів. Деякі речовини, такі як ІЛ-1 та ІЛ-8 та ФНП- $\alpha$ , стимулюють процес вивільнення з нейтрофілів ММП-8, що сприяє активації запальних процесів [388, 389].

За умов ЛОС було виявлено збільшення вмісту ММП-8 в сироватці крові на 7 та 21 добу, відповідно в 1,4 та 1,35 раза, порівняно з контролем.

За КОС також було встановлено зростання концентрації ММП-8, максимально – на 7 добу, в 1,4 раза, порівняно з контролем. Отримані результати свідчать про те, що ММП-8 відіграє важливу роль у реакції на запалення за ХОС.

Кератиноцити, лейкоцити, макрофаги, фібробласти та моноцити є джерелами ММП-9. Рівень ММП-9, як правило, нижчий його експресії, може стимулюватися цитокінами включаючи ФНП- $\alpha$ , який зазвичай секретується запальними клітинами. ММП-9 пов'язана з розвитком запалення, може проявляти як про- так протизапальну активність. Приймає участь у відновленні, регенерації тканин, активації факторів росту та цитокінів [385-389].

За ЛОС було показано збільшення рівня ММП-9 у сироватці крові протягом усього експерименту, максимальні показники встановлено на 7, 15 та 21 добу – відповідно в 1,35; В 1,5 і 1,7 раза вище контрольних значень.

За умов КОС спостерігалась аналогічна тенденція. Вміст ММП-9 у сироватці крові перевищував контроль на 1 добу в 1,6 рази, а на 7 - у 1,5 раза. Максимальні значення показника встановлено на 15 та 21 добу, у 1,7 раза вище, порівняно з контролем.

За моделювання ХОС станом на 21 добу спостерігали зростання вмісту ММП, дані зміни можуть вказувати на розвиток запалення.

Протеолітична ферментна система подібна до системи АОЗ і характеризується поєднанням процесів захисту та відновлення. Така взаємодія здатна визначати стратегію клітини у боротьбі з руйнуванням білкових молекул. Первинний захист знижує імовірність атаки білка активними вільними радикалами. Він включає ферменти, що усувають вільні радикали, та АО, що блокують поширення їх шкідливого впливу. Через неможливість первинного захисту повністю нівелювати негативний ефект вільних радикалів виникає необхідність формування системи вторинного захисту. Механізми вторинного захисту повністю усувають або відновлюють пошкоджені молекули. Різні протеолітичні ферменти можуть діяти як вторинні захисні компоненти, руйнуючи окиснені білки і тим самим запобігаючи накопиченню змінених та пошкоджених білків у клітині [390].

Ферменти протеолізу беруть участь у фізіологічних та обмінних процесах, регуляції гомеостазу, руйнуванні тканин та їх відновленні. Протеїнази регулюють вміст медіаторів запалення та утворення активних форм ферментів, які беруть участь у реакції попередників запалення [391,392].

Однак дані про активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів при опіках стравоходу в літературі відсутні. Отримані нами результати

дозволять оцінити характер процесу регенерації опіку стравоходу і, отже, розробити ефективні методи спрямованої корекції протеолізу.

Було досліджено активність ферментів загальної протеолітичної системи у плазмі крові щурів за ЛОС та КОС (рис. 4.1.1, рис. 4.1.2).

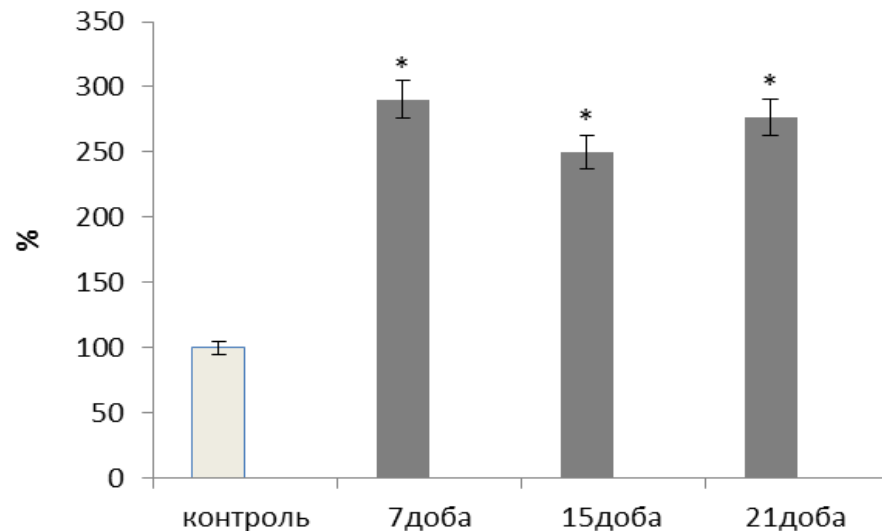


Рис. 4.1.1. Загальна протеолітична активність у плазмі крові щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

За ЛОС загальна протеолітична активність у плазмі крові підвищувалась впродовж всього експерименту, на 7, 15 та 21 добу на в 3,94, 3,54 та 3,95 раза порівняно з контрольними значеннями.

На перших етапах дослідження, ще на стадії шоку спостерігається активація протеолітичних ферментів під впливом катехоламіну, кальцію. Відбувається гіпоксія, метаболічні порушення в наслідок чого відбувається пошкодження клітинних мембран [393].

За ЛОС загальна протеолітична активність у плазмі крові підвищувалась впродовж всього експерименту, на 7, 15 та 21 добу на в 3,94, 3,54 та 3,95 раза порівняно з контрольними значеннями.

На перших етапах дослідження, ще на стадії шоку спостерігається активація протеолітичних ферментів під впливом катехоламіну, кальцію.

Відбувається гіпоксія, метаболічні порушення в наслідок чого відбувається пошкодження клітинних мембран [393].

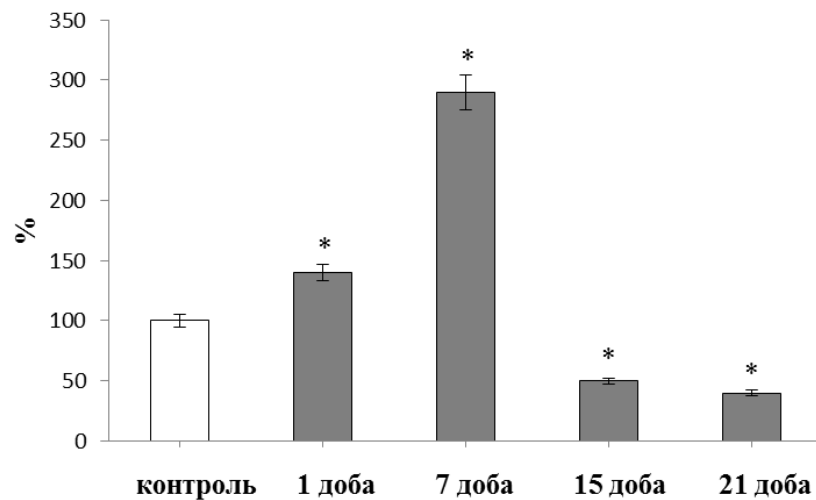


Рис. 4.1.2. Загальна протеолітична активність у плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

За КОС виявлено зростання загальної активності протеолітичних ферментів у плазмі крові щурів на 1 та 7 добу відповідно у 1,4 та 2,9 раза, порівняно з контролем. Зростання активності протеолітичних ферментів може свідчити про включення захисною реакцією. Відомо, що тканина, яка була пошкоджена розпадається на продукти і ці продукти легко потрапляють до організму, або виводяться з нього. Встановлено також, що зростання протеолізу впливає загоєння негативно. Джерелом ендогенних інгібіторів протеїнази є печінка та й клітини крові, а саме: нейтрофіли, моноцити, лімфоцити. Були проведені дослідження за термічного опіку в експерименті на щурах, показано збільшення активності ферментів через 7 днів після травми. Поворотна активація протеолітичних ферментів може відбуватися під впливом різних факторів, таких як катехоламіни,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$  [394, 395].

За ЛОС На 15 та 21 добу за умов КОС загальна протеолітична активність ферментів в крові тварин, навпаки, була нижча контрольних значень у 1,5 та 2 раза відповідно. У дослідах за термічного опіку було

показано, що загальна протеолітична активність зменшувалась з 14 доби після травми [395].

Протеолітичні ферменти представлені трьома групами - сериновими протеїназами, металопротеїназами та цистеїновими протеїназами. Ці ферменти приймають участь у процесі деградації білків при патологічних станах. Серинові протеїнази приймають участь у лізисі компонентів позаклітинного матриксу в області рани. Підвищення активності серинових протеїназ може бути ключовою ланкою в розвитку патології, що супроводжується запальною реакцією. Металопротеїнази - це ферменти, які контролюють процесинг та такі процеси, як проліферація. Також МП приймають участь у адгезії, міграції, беруть участь у деградації ЕЦМ [296, 297].

Тому нами було досліджено активність серинових та металопротеїназ у плазмі крові експериментальних тварин за ЛОС та КОС (рис. 4.1.2 (А),(Б)), (рис.4.1.3.(А), (Б))

За умов ЛОС було показано зростання активності серинових протеїназ у плазмі крові на 7, 15 та 21 добу - у 4,7, 4,4 та 4,3 рази відповідно, порівняно з контролем. Активність металопротеїнази також збільшувалась на 7, 15 та 21 добу за ЛОС - в 2,3, 2,3 та 2,7 рази відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

Також нами було досліджено серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові щурів в експериментальній моделі КОС. Було виявлено поступове збільшення активності металопротеїназ: на 1 добу після опіку даний показник був у 1,2 раза вище контрольного, а на 7 добу експерименту - у 2,5 раза. На 15 та 21 доби активність металопротеїназ знизилась у 2,3 та 3,4 раза відповідно, відносно контрольних показників.

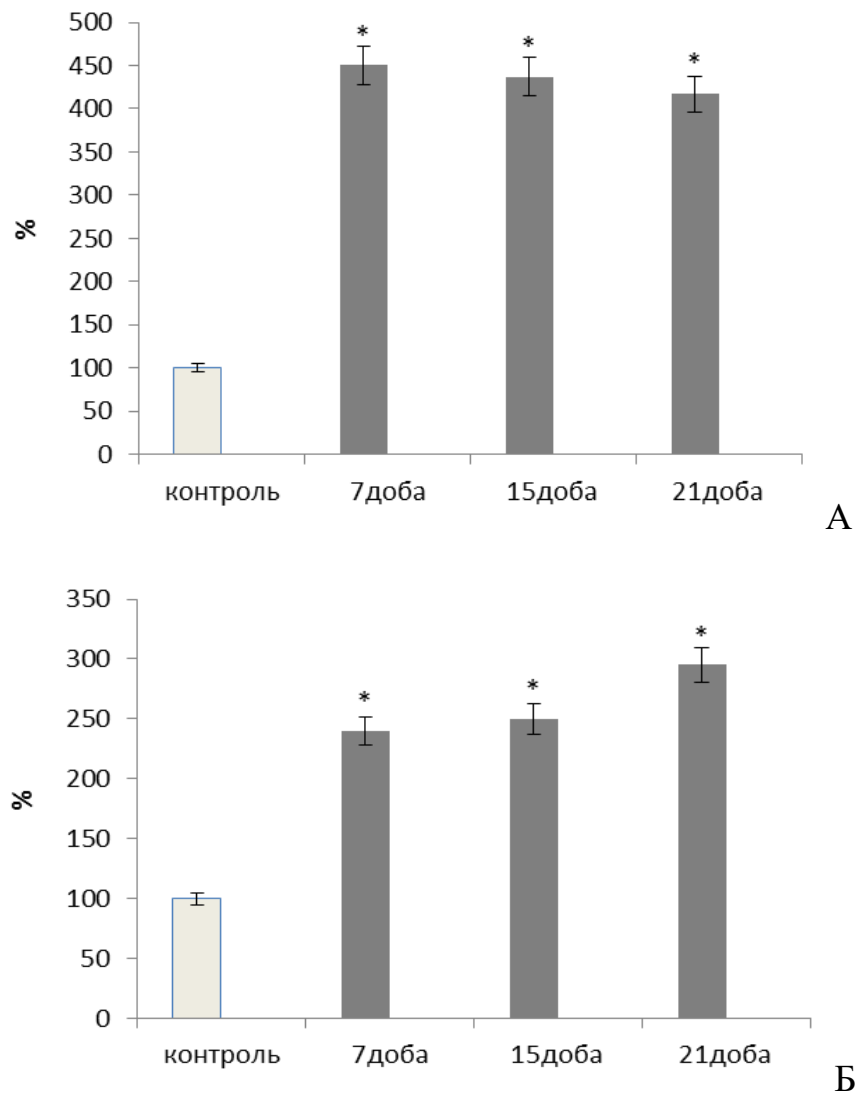


Рис. 4.1.2. Активність серинових протеїназ (А) та металопротеїназ (Б) в плазмі крові за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ; \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Зміни, які ми спостерігаємо за опіку стравоходу, а саме підвищення активності МП може бути пов'язано з розвитком запалення, а також з надходженням протеїназ із зруйнованих тканин та клітин [298].

Активність серинових протеїназ за КОС також зростала тільки в початкові терміни дослідження – перевищувала контроль на 1 та 7 добу в 1,4 і 2 рази відповідно. На 15 і 21 добу даний показник, навпаки, знижувався у 1,5 і 2,5 рази відповідно, порівняно з контролем.

Серинові протеїнази є найбільш поширеною групою протеолітичних ферментів. Вони беруть участь в процесах обміну речовин, клітинної передачі сигналів тощо. Відсутність активності ферменту, або її зниження відбувається за умов утворення комплексів з інгібіторами та їх елімінацію з кров'яного русла, а також може вказувати на міграцію ферментів до місця опіку, як правило серинові протеїнази накопичуються в місці запального процесу [299, 300, 334].

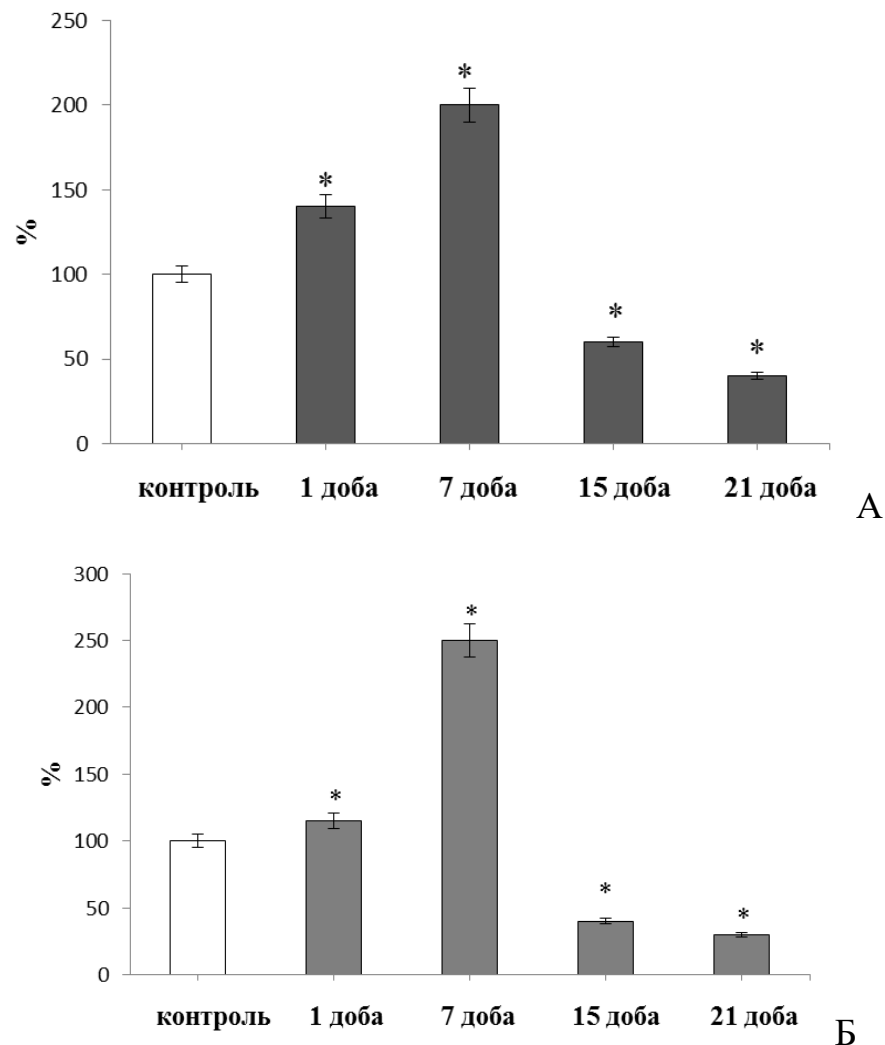


Рис. 4.1.3. Активність серинових (А) та металопротеїназ (Б) протеїназ в плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу (M±m, n=8; \* - p<0,05 порівняно з контролем)

Протеолітичні інгібітори є одним із захисних механізмів організму проти протеолітичних ферментів. Вони можуть бути ендогенного та екзогенного походження, містяться в тканинах і крові. Дисбаланс інгібіторів та протеїназ призводить до різних патологічних станів. На активність протеїназ впливає швидкість їх утворення та їх інактивація конкретними інгібіторами [402].

$\alpha$  1-антитрипсин-інгібітор серинової протеїнази, який є специфічним в першу чергу по відношенню до нейтрофільної еластази, захищаючи таким чином тканини від протеолітичної деградації.  $\alpha$  2-макроглобулін бере участь у регуляції активності серинових та металопротеїназ. Макроглобуліни також є транспортерами цитокінів до клітин [396-401].

Визначали активність  $\alpha$ 2-МГ та  $\alpha$ 1-АТ у крові щурів за умов лужного та кислотного опіку (рис. 4.1.4 (А), (Б)) та (рис. 4.1.5 (А), (Б))

За ЛОС було спостерігали зростання активності  $\alpha$ 1-АТ на 15 добу в 1,6 раза, порівняно з контрольною групою. Активність антитрипсину на 7 та 21 добу не зазнала змін і була на рівні контролю. За опіку стравоходу активність  $\alpha$ 2-МГ зростала в усі терміни дослідження за ЛОС, досягаючи максимального показника на 21 добу – в 1,9 раза більше за контроль.

Таким чином, збільшення загальної протеолітичної активності в плазмі крові щурів в ході експерименту призводить до зростання також активності інгібіторів. Підвищена активність  $\alpha$ 2-МГ також може вказувати на запалення. Отже, зростання активності серинових протеїназ, металопротеїназ та  $\alpha$ 2-МГ, може вказувати на пошкодження, які призводять до хронічного запального процесу.

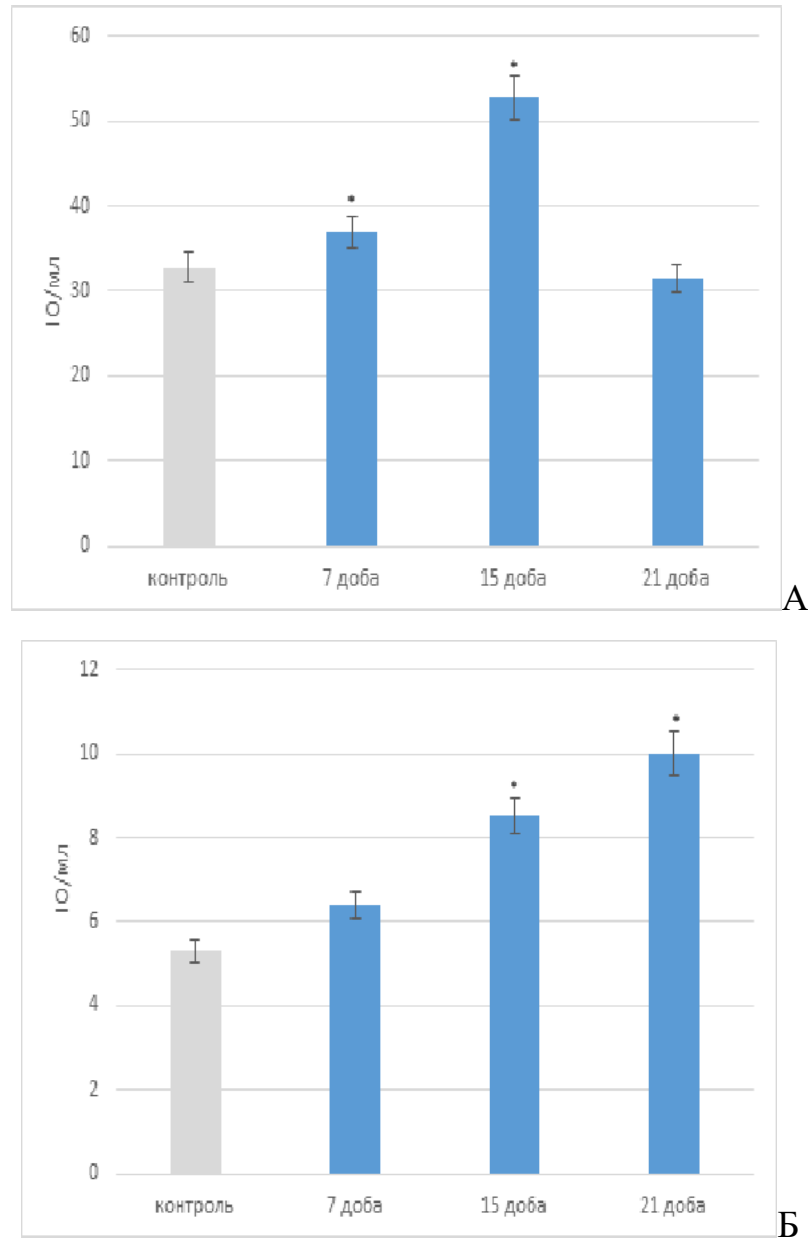


Рис. 4.1.4. Активність  $\alpha 1$ -антитрипсину (А) та  $\alpha 2$ -макроглобуліну (Б) в крові щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Дослідження активності  $\alpha 2$ -MG і  $\alpha 1$ -AT в плазмі крові щурів в моделі кислотного опіку виявило наступні зміни. Активність  $\alpha 1$ -AT перевищувала контроль протягом усього експерименту – на 1, 7, 15 і 21 добу в 1,5; 2,2; 1,6 і 1,3 раза відповідно.

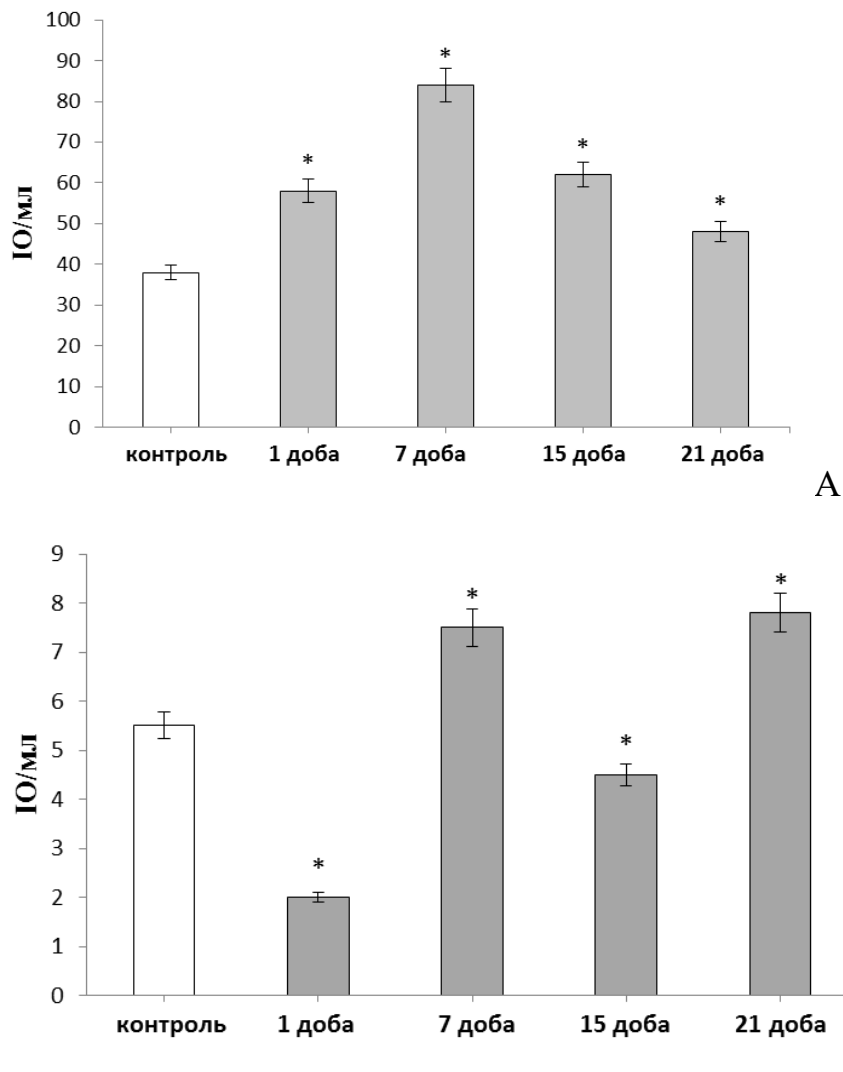


Рис. 4.1.5. Активність  $\alpha_1$ -антитрипсину (А),  $\alpha_2$ -макроглобуліну (Б) у крові щурів за кислотного опіку стравоходу (M $\pm$ m, n=8, \*- p<0,05 порівняно з контролем)

Зміни активності  $\alpha_2$ -MG за КОС мали різнонаправлений характер. На 1 і 15 добу даний показник був нижчим за контроль в 2,8 і 1,2 раза відповідно.

На 7 та 21 доби активність інгібітора перевищувала контроль в 1,4 та 1,5 раза відповідно. Підвищена активність  $\alpha_2$ -MG може вказувати на запалення та розвиток інфекційного процесу в рані.

Підвищена концентрація  $\alpha_2$ -MG пов'язана з протеїназами та посилює апоптоз пошкоджених клітин, регулює активність фагоцитів і є індикатором локалізації некрозу [403].

Ферментативна активність визначається рівнем експресії генів ферментів та наявністю активаторів і інгібіторів. ММП належать до індукованими ферментами. Їх транскрипція залежить від різних факторів: стероїди, гормони щитовидної залози, цитокіни, фактори росту, хімічні агенти. Винятком може вважатись ММР-2, експресія якої є системною. Експресія ММП та експресія білків гострої фази є схожими, вони регулюється протизапальними цитокінами та бактеріальними ліпополісахаридами. ММП - це високоактивні ферменти, які розщеплюють позаклітинні компоненти. Протеолітична активність ММП регулюється активацією проферментів, ендогенними інгібіторами, ТІМП. ТІМП контролюють активність всіх ММП та інгібують руйнування позаклітинної матриці. Всі ТІМП складаються з двох доменів, перший домен відповідає за гальмування, другий домен зв'язує про-желатинази. ТІМП стимулюють стимулює проліферацію клітин, інгібують ріст пухлини, метастази та ангиогенез [399, 380, 381].

За моделювання ЛОС було визначено вміст ТІМП-1 у сироватці крові та показано його зменшення. Вміст ТІМП-1 у сироватці крові зменшився у 1,35 та 1,15 раза, на 15 та 21 добу відповідно, порівняно з контролем (табл. 4.1.2).

Таблиця 4.1.2

**Вміст ТІМП-1 (ум.од./мг білка) у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ТІМП-1 (ум.од./мг білка)	ЛОС	9,7±0,3	9,1±0,3	7,2±0,5*	8,4±0,2*
	КОС		7,6±0,3*	8,3±0,3*	10,1±0,3

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

За КОС також було встановлено зниження вмісту ТІМП-1 у сироватці крові щурів на 7 та 15 добу в 1,2 раза порівняно з контролем. На 21 добу показник наближався до рівня контролю.

Відомо, що за нормального стану процеси синтезу та деградації колагену урівноважені. Це відбувається завдяки збалансованій взаємодії системи МП та її тканинних інгібіторів. В наслідок надмірного синтезу колагену відбувається погіршення процесу загоєння ран за опіку. Такі зміни обумовлені дисбалансом у співвідношенні матричних МП та ТІМП. Довготривалий дисбаланс з надмірною протеолітичною активністю вказує на хронічне захворювання. Неконтрольована активність протеїназ є одним з механізмів патологічного загоєння. Підвищена кількість протеїназ негативно впливає на заживлення, сприяючи формуванню патологічного рубця, а продукти які вивільняються під час розпаду, впливають на хронічне запалення [370, 373].

ТІМП-1 має безліч функції та інгібіторних властивостей, пов'язаних з ММП. Він здатний активувати нейтрофіли при сепсисі та захищати їх від апоптозу. ТІМП-1 вважають маркером гострого запалення. Згідно з деякими дослідженнями, рівень хронічного інгібітора металопротеїназ, а саме ТІМП-1, зростає при хронічних ранах [373].

Таким чином, показані зміни протеолітичного профілю, які відбуваються за ХОС, а саме підвищення протеолітичної активності серинових та металопротеїназ, зростання активності інгібіторів  $\alpha 2$ -МГ та  $\alpha 1$ -АТ, а також зниження вмісту ТІМП-1 на тлі зростання вмісту матричних металопротеїназ.

## **4.2 Протеолітичний баланс у слизовій оболонці за хімічного опіку стравоходу**

Вміст та активність ММП за умов нормального та патологічного загоєння ран активно досліджується, проте, через недостатню кількість експериментальних даних, залишається нез'ясованою роль ММП за ХОС [381, 393]. Тому нами було визначено вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 у тканинах стравоходу при ХОС.

З умов ЛОС у тканинах стравоходу вміст ММП-1 був найбільш високим на 7 добу - в 1,3 раза більший за контроль. За умов КОС вміст ММП-1 підвищився, у слизовій стравоходу на 1 добу в 2,1 раза. Станом на 7 добу відбулось незначне знизився, на 15 та 21 добу рівень вміст ММП-1 знову почав зростати, порівняно з контрольною групою шурів. На 21 добу вмісту ММП-1 у слизовій стравоходу за КОС зростав у 2,2 раза вище контрольних значень.

За лужного опіку максимальний вміст ММП-2 у слизовій стравоходу був виявлений на 7 та 21 добу - в 1,46 раза та 1,5 раза відповідно більший за контрольні значення. За КОС Найбільший показник вмісту ММП-2 в тканинах стравоходу показаний на 1 та 15 доби - відповідно у 2,2 та 2,3 раза вищий, порівняно з контролем. ММП-2 розщеплює молекули ЕЦМ і тим самим пригнічує важливі процеси, як приклад - ангиогенез. Підвищення рівня ММП-2 може вказувати на роль цього ферменту в процесах регенерації, а також резорбції рубців. ММП-2 експресується у клітинах фібробластів під час утворення та регенерації тканин. Він також синтезується нейтрофілами, макрофагами та моноцитами, бере участь у пригніченні процесів запалення, тим самим впливає на переробку цитокінів [164].

Таблиця 4.2.1

**Вміст матриксних 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

За ЛОС вміст ММП-3 у слизовій стравоходу за ЛОС максимально зростав на 7 добу - в 1,64 раза, порівняно з контролем. За КОС даний показник перевищував контроль в усі терміни дослідження, найбільше значення спостерігалось на 21 добу після опіку - у 1,9 раза вище за контроль. ММП-3 каталізує деградацію компонентів сполучної тканини, починає вмикати протеоглікани, колаген, ламінін та фібронектин. Він виділяється у вигляді бензолу і в природних умовах активується шляхом обмеженого протеолізу через тканинні та плазмові ендопептиди. ММП-3 відіграє важливу роль у природній регенерації та патологічних процесах. Низький вміст ММП-3 при загоєнні ран може свідчити про загрозу виникнення проліферативних процесів адгезії з розвитком безперервної деформації фіброзу, є дані щодо впливу ММП-2 та ММП-3 на загоєння травм після опіку [404-406].

За ЛОС вміст ММП-8 в тканинах стравоходу найбільше зростав на 7 добу в 1,32 раза порівняно з контролем. При дослідженні за КОС було виявлено підвищення вмісту ММП-8 у 1,5 рази станом на 1 добу у слизовій оболонці стравоходу. Вміст ММП-8 поступово знижувався станом на 7 та 15 доби. На 21 добу спостерігали підвищення показника у 1,8 раза вище контрольних значень. Результати, які ми отримали вказують на підвищення вмісту ММП-8, та можуть свідчити про важливу роль даної протеїнази за модулювання запальної відповіді за хімічного опіку стравоходу. ММП-8 є важливим показником при початковому руйнуванні ЕЦМ. Особливе значення має даний показник при патологічних запальних процесах. Відомо, що для синтезу та реалізації активності ММП-8 в місцях хронічного запалення ММП потребує участі прозапальних цитокінів [407].

За ЛОС в тканинах стравоходу відмічався високий вміст ММП-9 на 7 та 21 добу - відповідно в 1,5 та 1,6 раза , порівняно з контролем. За КОС рівень ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу зростав на 1 та 7 добу - в 1,4 та 1,6 раза відповідно. На 15 добу показник знизився, але був вище контрольних значень за даної патології. У слизовій максимальне значення вмісту ММП-9 у тканинах стравоходу було виявлено на 21 добу - у 1,7 раза вище контролю .

ММП-9 відіграє важливу роль у розвитку запалення і впливає на ряд процесів: ремоделювання, регенерації, процесінг цитокінів. В процесі ангиогенезу ММП-9 з ММП-2 проявляють свою активність та ініціюють утворення судин на початковій стадії васкуляризації. ММП-8 та ММП-9 здатні вплинути на розщеплення молекул колагену на маленькі фрагменти. Загоєння - це процес, що вимагає, появи сигнальних молекул і їх рецепторів в потрібний час і в потрібному місці. Внаслідок чого МП, здатні розрізати і трансформувати всі ці молекули, змінюючи при тому їх активність, а також відіграють важливу роль у процесі загоєння [408, 409].

Порушення рівноваги між активністю протеолітичних ферментів та їх інгібіторами, відбувається за різних патологій. [379]. В сучасній літературі недостатньо даних щодо активності протеолітичних ферментів та інгібіторного потенціалу у слизовій оболонці при опікових травмах стравоходу. Нами було визначено загальну активність протеолітичних ферментів у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС (рис. 4.2.1).

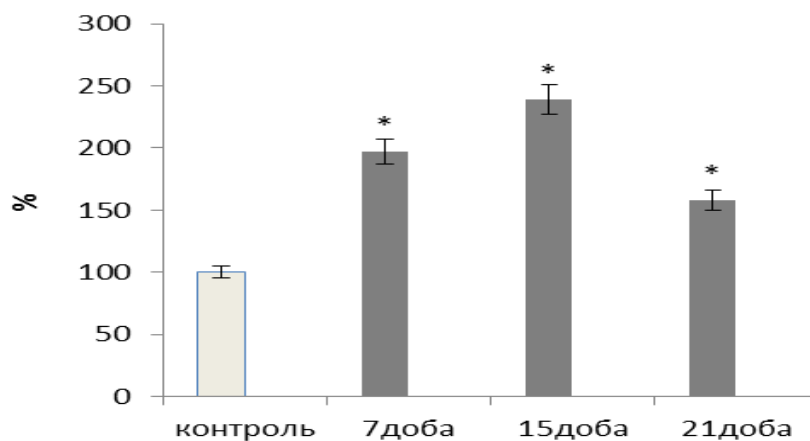


Рис. 4.2.1. Загальна протеолітична активність у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Досліджуючи загальна протеолітична активність за умов моделювання лужного опіку в тканинах стравоходу ми встановили зростання активності на 7 добу на 96%, на 15 добу на 137%, на 21 добу на 65%., порівняно з контрольними значеннями.

Серинові та металопротеїнази є найбільш активними протеолітичними ферментами при процесах загоєння, тому нами було визначено їх активність у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС (рис.4.2.2, 4.2.3).

За моделювання лужного опіку було виявлено зростання активності металопротеїназ та серинових протеїназ впродовж всього експерименту. В тканинах стравоходу показано збільшення активності серинових протеїназ на 7 добу на 102%, на 15 добу на 115%, на 21 добу на 39%., порівняно з

контрольними значеннями. При дослідженні активності матричних металопротеїназ було виявлено зростання на 7, 15 та 21 добу на 55%, 133% та 66% відповідно.

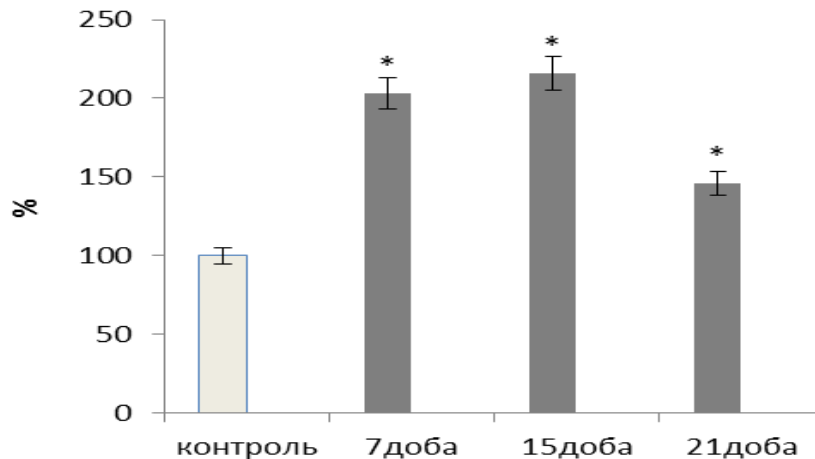


Рис. 4.2.2. Активність серинових протеїназ у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Підвищена активність протеїназ може вказувати на активний процес епітелізації. Були відмічені високі показники на 15 добу. Цей період можна охарактеризувати зростанням ростом колагенових волокон, а також секрецією металопротеїназ для забезпечення щільності грануляційної та нормальної епітелізації тканини. Таким чином, на 21 добу за ЛОС були високі показники активності МП та серинових протеїназ, що вказує на хронізацію запального процесу.

Саме порушення балансу між матричними протеїназами і ТІМП призводить до змін у протеолітичних процесах в тканині. Встановлено, що ТІМП-1 є універсальним інгібітором більшості металоматричних протеїназ [370, 372].

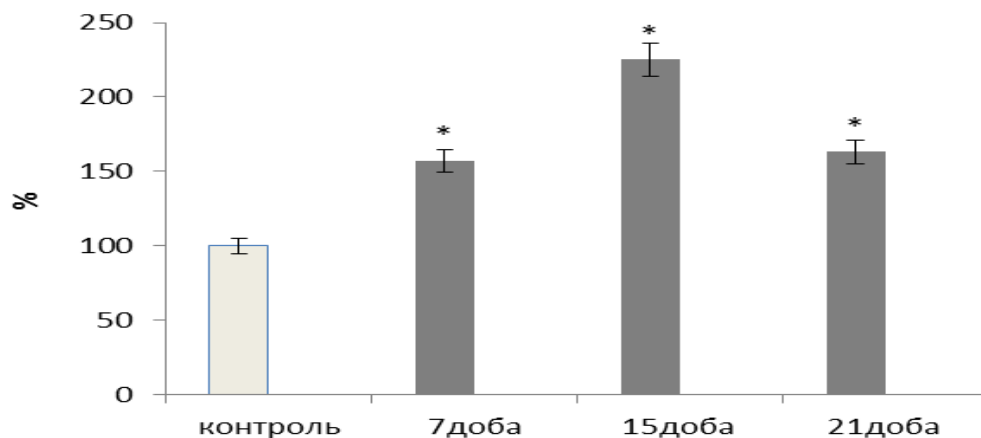


Рис. 4.2.3. Активність металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Нами було визначено вміст ТІМП-1 у слизовій оболонці стравоходу за умов моделювання ЛОС та показано його зниження на 21 добу в 1,4 раза, порівняно з контролем (табл.4.2.2).

Також ми визначали вміст ТІМП-1 у слизовій оболонці стравоходу за умов моделювання КОС (табл.4.2.2). Рівень ТІМП-1 в тканинах стравоходу зростав протягом усього експерименту. За опіку стравоходу станом на 1 та 7 доби даний показник був вище за контрольних значень у 1,4 та 1,6 раза, відповідно. На 15 добу вміст ТІМП-1 дещо знизився, але був вище за контроль у 1,2 раза. Максимальне значення було відмічено на 21 добу після моделювання опіку стравоходу, у 1,9 раза вище за контрольні значення.

Таким чином, за нормального стану процеси синтезу і деградації колагену урівноважені в тканинах, це відбувається завдяки збалансованій дії системи МП та їх ТІМП. Порушення процесу загоєння після опіку є причиною надмірного синтезу колагену, який спричинений дисбалансом у співвідношенні металоматричних та їх інгібіторів [370].

Таблиця 4.2.2

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

Показник	Умови дослідю	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Вміст ТІМП-1 (ум.од./мг білка)	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

При порушенні рівноваги між активністю протеїназ та їх інгібіторів у бік протеолітичної активності деградація білків міжклітинного матриксу триває. Встановлені зміни можуть вказувати на продовження хронічного запалення. Відомо, що неконтрольована протеїназна активність є одним з головних патологічних механізмів ран, які не загоюються. Зростаюча кількість протеїназ згубно впливає на колаген. Вона запобігає таким чином утворенню рубця, а продукти розпаду стимулюють подальший процес запалення. Встановлено, що ТІМП-1 володіє функціями, які не залежать від його інгібуючої дії по відношенню до матричних протеїназ. Зокрема, потенціал еритроїдної дії, антиангіогенний і профібротичний потенціали, тощо. При сепсисі ТІМП-1 здатен активувати нейтрофіли, таким чином, захищаючи їх від апоптозу. Тому, ряд дослідників вважає, що досліджуваний тканинний інгібітор є своєрідним маркером запалення. Також є дані, стосовно ТІМП-1, рівень якого зростає саме у хронічних ранах [409, 373].

Таким чином, нами 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.

**Дослідження вмісту шаперонів та протеасомної активності у слизовій оболонці стравоходу за хімічного опіку стравоходу.** З літературних даних відомо, що протеоліз здійснюється в цитоплазмі за складною і багатоступінчатою системою. Важливо, що до складу цієї схеми входить поліферментний комплекс протеасома, а також шаперони.

Шаперонами є універсальні консервативні білки. Такі білки здатні зв'язувати інші білки і стабілізувати їх конформацію. Шаперони мають АТФ-азну активність і здатні гідролізувати АТФ. Таким чином, вони здатні забезпечувати енергією процес згортання поліпептидного ланцюга.

Як відомо з літературних даних до цитозольних шаперонів відносяться Hsp70 та Hsp60. Вказані шаперони здатні стимулювати і стабілізувати різноманітні сигнальні шляхи. Шаперони здатні впливати на імунomodуляцію, і тим самим, забезпечувати захист клітин. Вони перешкоджають тому, щоб накопичувались денатуровані чи неправильно згорнуті білків.

Нами було досліджено вміст шаперону Hsp 60 та Hsp 70 у слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (табл. 4.2.3, табл. 4.2.4.). Встановлено, що вміст Hsp 60 на 1 та 7 доби був дещо нижче за контроль. Станом на 15 добу він починав зростати, і на 21 добу перевищував контрольні значення у 1,2 раза. А за ЛОС зміни більш виражені – вже на 1 добу – зростання в 1,26 раза, а на 21 – майже 1,3 раза.

Вміст Hsp 70 у слизовій оболонці стравоходу щурів (табл.4.2.4) був нижчий за контроль протягом всього досліджуваного періоду в експериментальній моделі як лужного, так і кислотного опіку стравоходу. В умовах стресу (окисного, теплового, хімічного) спостерігається масоване пошкодження білкових молекул, шаперони мобілізуються на виправлення білків, які втратили правильну тривимірну структуру, і рівень Hsp падає нижче критичного для ефективного контролю згортання синтезованих *de novo* поліпептидних ланцюгів [150].

Таблиця 4.2.3

**Вміст шаперону Hsp 60 (ум.од./мг білка) у слизовій оболонці  
стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Hsp 60 (ум.од./мг білка)	ЛОС	0,084±0,001	0,106±0,001*	0.089±0,002*	0.099±0,001*	0.109±0,002*
	КОС		0,087±0,001*	0.089±0,001*	0.095±0,001*	0.103±0,002*

\*p<0,05 порівняно з контролем

Hsp60 - це молекулярний шаперон, який бере участь в фолдінгу і збірці мітохондріальних білків та полегшує протеолітичну деградацію білків, що неправильно конформовані або денатуровані. Hsp70 має здатність зв'язується з білками, які не згорнулися або частково згорнулися. Вказаний шаперон має властивість запобігати агрегації білків або неправильному фолдінгу [410]. Вчені проаналізували зміни синтезу Hsp 70 після теплового шоку та встановили, що найбільше зростання експресії Hsp70 в клітинах спостерігається через приблизно 7-8. Даний шаперон здатен підтримувати експресію на високому рівні від 4 до 5 години. Через добу після шоку експресія Hsp70 значно знижується.

Таблиця 4.2.4

**Вміст шаперону Hsp 70 (ум.од./мг білка) у слизовій оболонці  
стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС				
		Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Hsp 70 (ум.од./мг білка)	ЛОС	0.110±0,001	0.097±0,002*	0.083±0,001*	0.091±0,001*	0.101±0,001*
	КОС		0.097±0,002*	0.083±0,001*	0.079±0,001*	0.092±0,001*

\*p<0,05 порівняно з контролем

Встановлено, що шаперони 60 та 70 є АТФ-залежними. З літературних даних відомо, що зниження рівня досліджуваних шаперонів може говорити про зменшення вмісту АТФ на початку опікової хвороби.

Внаслідок опікових уражень виникає порушення метаболічних процесів, вони поєднані зі зміною структури білків та ініціюються при цьому порушеннями, які відбулися за окисно-відновних процесів, такі зміни посилюють глікогеноліз та активують розпад вуглеводів. Хімічний опік стравоходу викликає денатурацію білків у місці опіку та призводить до порушення біохімічних процесів, в яких утворюється АТФ. Через час молекулярно-біохімічні механізми адаптації вмикаються та запускаються компенсаторні шляхи синтезу АТФ регуляторних білків (Hsp 60 та Hsp 70). Такі зміни, підтверджуються літературними даними [411]. Дослідження інших авторів, показували, що активність АТФази лізосоми міокарда була значно нижчою, ніж величина в контрольній групі [412].

Таким чином, ХОС призводить до зменшення кількості АТФ, що викликає порушення у роботі Hsp 60 та Hsp 70, та викликає руйнування білків в процесі протеолізу. Поєднання таких процесів, як згортання білків і протеоліз є важливою умовою для адаптації клітин та виживання в екстремальних умовах. Особливим типом протеїнази є протеасома - це велика протеїназа, яка здатна відігравати важливу роль у механізмах розвитку різних захворювань. Протеасоми мають ряд функцій, одна з яких полягає в тому, що вони приймають участь у деградації білків. Також протеасоми здатні впливати на багато клітинних процесів таких як, проліферація та регенерація ДНК [147].

Протеасоми слугують первинними сайтами для деградації білків у клітинах. Відомо, що кожна протеасомальна частина має два типи хімотрипсинових, два типи трипсиноподібних і два типи каспазоподібних протеолітичних сайта. Протеасома забезпечує модифікацію білків також вона здатна регулювати функціональну активність. Таким чином, протеасома володіє активністю - хімотрипсиноподібною (ХТП), відбувається гідроліз після гідрофобних та ароматичних амінокислот Leu, Tyr, Phe), володіє трипсиноподібною активністю (ТП), гідроліз після позитивно заряджених

Lys та Arg, та каспазоподібною активністю (КП), гідроліз після негативно заряджених Asp та Glu. Таким чином, протеасома має здатність забезпечувати модифікацію білків і регулює, їх функціональну активність [147].

Досліджуючи активність протеасом за ХОС ми виявили ряд особливостей (рис. 4.2.4, 4.2.5).

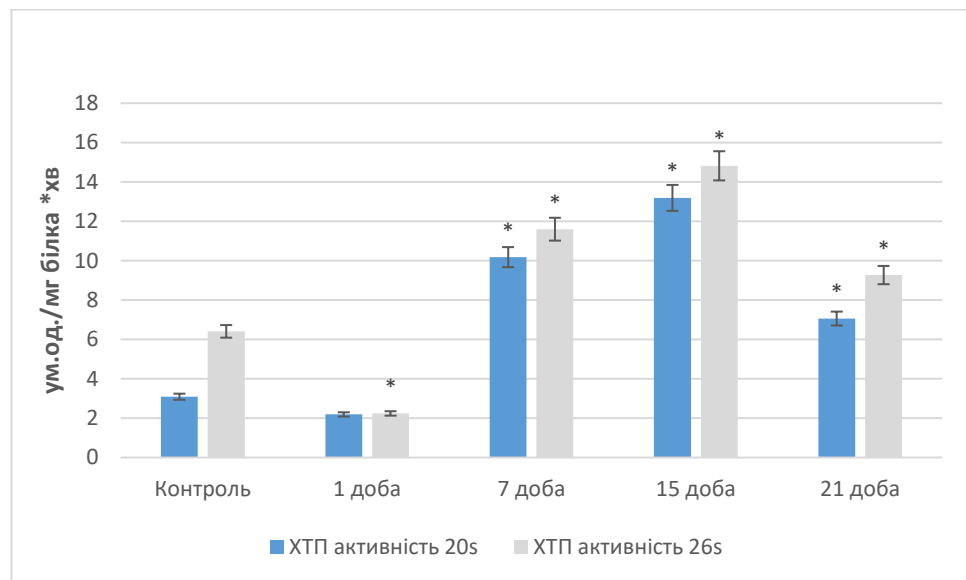


Рис. 4.2.4 Хімотрипсиноподібна активність протеасом у слизовій оболонці стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ; \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем )

Було показано істотне зниження загальної ХТП активності протеасом (26s) на 1 добу після КОС у 2,9 раза , порівняно з контролем. На 7 і 15 добу даний показник, навпаки, перевищував контроль відповідно у 1,8 та 2,3 раза. На 21 добу експерименту ХТП активність дещо зменшувалась, проте залишалась вище контрольного рівня у 1,4 раза. Подібна динаміка змін спостерігалась і по відношенню до ХТП активності каталітичного центру 20s. А саме: зниження досліджуваного показника на 1 добу після КОС в 1,1 раза,

його подальше істотне зростання у 3,3 та 4,3 раза відповідно на 7 та 15 добу, та зниження на 21 добу до рівня в 2,3 раза вище контрольного.

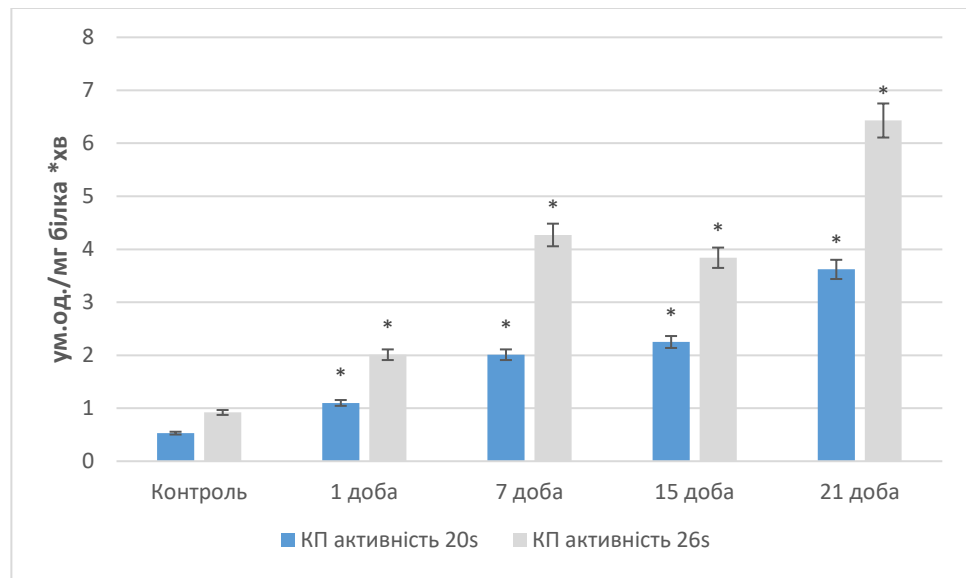


Рис.4.2.5. Каспазоподібна активність протеасом (ум.од./мг білка \*хв), у слизовій оболонці стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ; \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем )

Дослідження КП активності протеасом 26s та 20s виявило її збільшення протягом усіх термінів експерименту. Зокрема, на 1 добу після КОС КП активність протеасом 26s та 20s перевищувала контроль в 2,1 та 2,2 раза відповідно. В наступні терміни даний показник продовжував збільшуватись, досягаючи максимуму на 21 добу експерименту - в середньому у 7 разів вище за контроль.

Відмінність між загальною активністю 26s та 20s протеасом обумовлена АТФ-залежним протеолізом убіквітинованих білків в 26s протеасомі. Протеасома 20s має здатність проявляти свою активність як при убіквітин-залежному так і убіквітин-незалежному протеолізі. 20s здійснює це шляхом гідролізу малих пептидів та деяких денатурованих білків. Крім того 20s виступає каталітичним центром протеасоми і має великий спектр

пептидгідролазної активності. Відомо, що під час гідролізу пептидного ланцюга відбувається спочатку активація ХТП сайту. Цей сайт впливає на розщеплення його на пептидні фрагменти, потім ХТП сайт аллостерично інактивується. КП сайт каталізує гідроліз пептидів-продуктів першої стадії, на малі фрагменти. Потім спостерігаємо, як активні центри звільнюються і цикл повторюється знову [148].

З літературних джерел відомо, що статистично достовірне зростання протеасомної активності в крові відбувається у всіх групах через 12-16 годин після термічного опіку. За умов опіку протеасомна активність зростає. Внаслідок збільшення своєї активності може сприяти утворенню фіброзу в післяопікових ранах. Фіброз з'являється, як наслідок надмірного утворення рубцевої тканини. Фіброз може виникати в результаті збільшення росту фібробластів, також його виникнення пов'язують з активацією сигнального шляху TGF- $\beta$ . Рівень внутрішньоклітинного сигнального білка, як правило регулюється протеасомною активністю. Сигнальний білок здатен активувати транскрипцію генів-мішеней при стимуляції TGF- $\beta$ . Фіброз часто ускладнює лікування опікових хворих, тому в наш час все більшої популярності набуває розробка засобів на основі інгібіторів протеасоми, як способу запобігання/зменшення рубцюванню [147,411].

Отримані нами дані свідчать про те, що у слизовій оболонці стравоходу щурів після ХОС зростає активність протеасом. Такі зміни, можуть бути викликані посиленням процесів внутрішньоклітинного протеолізу в опікових ранах.

Таким чином доведено, що за ХОС відбувається підвищення загальної протеолітичної активності та активності серинових і металопротеїназ, зростання вмісту ММП та зниження вмісту ТІМП-1, що впливає на накопичення низькомолекулярних білків міжклітинного матриксу та свідчить про дисбаланс в системі протеолізу. Також було показано, що вмісту шаперонів знижувався за опіку стравоходу на тлі підвищення активності

протеасом у тканинах стравоходу щурів, що може вказувати на посилення протеолізу.

Отже, посилення функціонування системи протеолізу призводить до підвищеної деградації білкових молекул. Наступним етапом наших досліджень було дослідження змін білкового складу в тканинах щурів за хімічного опіку стравоходу. Відомо, що визначення присутності тих чи інших білкових фракцій може бути використано для оцінки стану організму за хімічного опіку різної етіології.

#### **4.3 Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов хімічного опіку стравоходу**

Протеоліз відіграє ключову роль не тільки в регуляції внутрішньоклітинного обміну, але і в таких процесах, як позаклітинний метаболізм, продукція активних ферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Надмірна активність ферментів регулюється та обмежується інгібіторами, які утворюють стійкі неактивні ферментні комплекси. Активні ферменти часто є активаторами інших білків і утворюють складні та багатофункціональні механізми активації, що контролюють багато метаболічних процесів. Очевидно, що порушення балансу подібних комплексів неминуче вплине на функціонування всього організму в цілому, формуючи молекулярну основу багатьох патологій [375, 376].

Опік володіє схильністю до хронічного характеру через тривалий запальний процес і високу протилітичну активність. Протеолітичні ферменти здатні викликати деградацію всіх компонентів позаклітинного матриксу в тканинах і судинах, а їх рівень у крові контролюється складною системою білків-інгібіторів [375-378].

Трипсиноподібні серинові протеїнази беруть участь у численних біохімічних процесах. Наприклад, вони залучені у гідролізі білків позаклітинного матриксу, чим сприяють ре модулюванню тканин.

Трипсиноподібні серинові протеїнази активують проферменти Підшлункової залози [413].

Нами було показано достовірне збільшення концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ в плазмі крові щурів за умов ЛОС на 7 добу на 71,6%. В подальші терміни дослідження на 15 та 21 добу даний показник, навпаки, зменшувався, порівняно з контролем, відповідно на 29,9% та 19,4% (рис. 4.3.1).

Такі зміни рівня трипсиноподібних серинових протеїназ в плазмі крові щурів можуть бути викликані розвитком оксидативного стресу. Наслідки хімічного опіку стравоходу викликають пошкодження клітинних мембран, вихід в кровотік, а також зниження синтезу інгібіторів протеолізу [375-378].

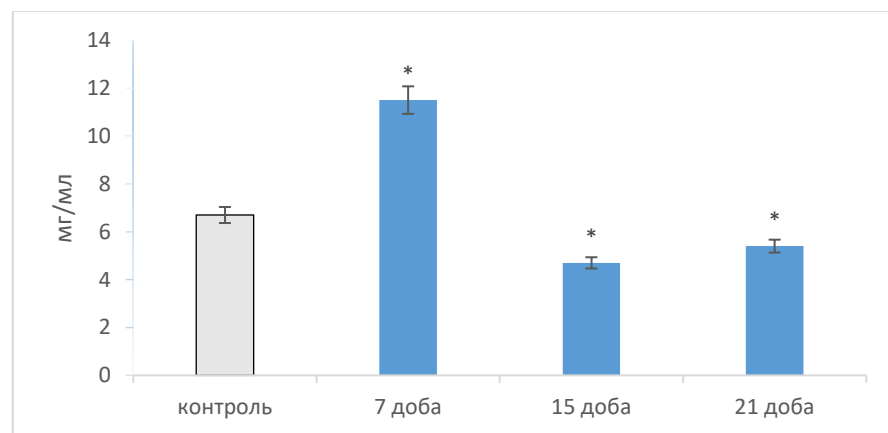


Рис. 4.3.1. Концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу (M±m, n=8, \*- p<0,05 порівняно з контролем)

Плазмін (ЕС 3.4.21.7) - це основний фермент фібринолітичної системи, який циркулює в кровотоці у формі неактивного проферменту – плазміногену. Плазміноген виступає полі функціональним білком, який

залучений в регуляції багатьох процесів: запаленні, ремоделюванні тканин, інвазії пухлинних клітин тощо [414].

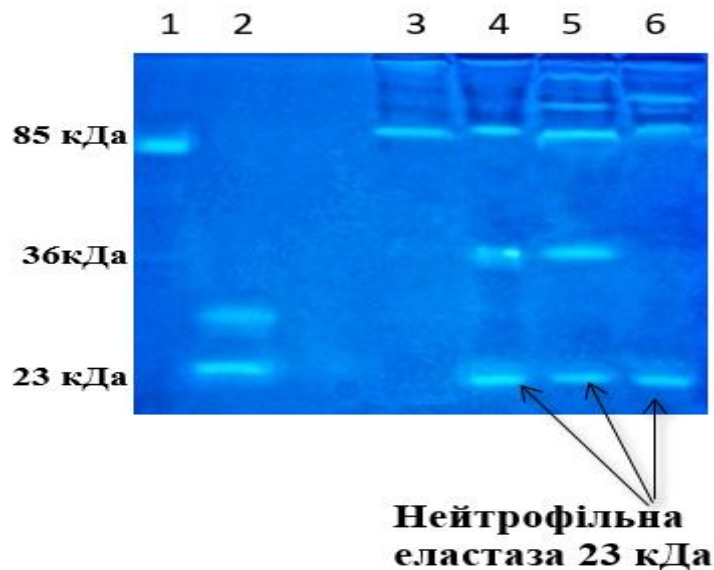


Рис. 4.3.2. Ензимограма трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ); 1,2-маркери, 3- контроль, 4,5,6 - ЛОС 7, 15, 21 доба

В результаті аналізу ензим-форезу трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу була виявлена велика кількість низькомолекулярних активних протеолітичних ферментів (рис. 4.3.2): 127, 116, 106, 95 та 90 кДа, які імовірно відповідають трипсиноподібним ферментам крові. Трипсиноподібні серинові протеїнази утворюються в наслідок деградації плазміну.

Було показано зростання рівня фракції М.м. 85 кДа, що відповідає плазміну, на 15 добу за ЛОС на 40%, порівняно з контрольними значеннями. При порівнянні треків плазми щурів з ЛОС та контрольних щурів, було виявлено присутність низькомолекулярних похідних плазміну як за норми, так і за патології. Спостерігали істотні відмінності від норми ензим-форезу трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові щурів у моделі ЛОС як за кількісними показниками, так і за якісним розподілом низькомолекулярних похідних плазміну.

Таблиця 4.3.1

**Якісний склад отриманих фракцій трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Фракції	Групи щурів з ЛОС			
	контроль	7 доба	15 доба	21 доба
кДа				
106	+	-	-	-
95	+	+	+	+
90	+	+	+	+
85 плазмін	+	+	+	+
75 д.ф. плазміну	-	+	-	+
43 д.ф. плазміну	+	+	-	-
36 міні плазмін	-	+	+	-
23 еластаза	-	+	+	+

Зокрема, за умов ЛОС була виявлена фракція з М.м. 36 кДа, що імовірно відповідає продукту автолізу плазміну – міні-плазміну, яка була відсутня в контролі. Це може бути свідченням надмірної активності плазміну за умов опіку, що призводить до його деградації. Також в моделі ЛОС було виявлено низькомолекулярні фракції з М.м 74, 54, 43, 36, 23 кДа. фракція з М.м 23 кДа може відповідати еластазі. За умов ЛОС на 21 добу була показана фракція з М.м 23 кДа, яка може відповідати еластазі (табл. 4.3.1).

**Білковий склад сироватки крові та слизової оболонки за умов хімічного опіку стравоходу.** Кількісний та якісний склад білків зазнає значних змін практично за усіх патологічних станів чи при вроджених дефектах білкового синтезу. Дані порушення можуть полягати як у змінах загальної кількості білків (гіпопротеїнемія, гіперпротеїнемія), так і співвідношенням окремих білкових фракцій (диспротеїнемія), при збереженні загальної концентрації білка у крові.

Широко застосовуваним методом біохімічного аналізу є електрофорез, який можна використовувати для оцінки цілого ряду життєвих процесів. Метод електрофорезу дозволяє визначити білковий склад крові, а також дослідити зміни гуморальної ланки імунітету, маркери гострого та хронічного запалення, нефротичного процесу, вивчити параметри внутрішньо-судинного гемолізу. В дослідженні білкового складу електрофорез перш за все дозволяє розділити білки на дві основні фракції – альбумінову та глобулінову [186].

Наприклад, за умов гострого запального процесу з вираженою локалізованою біохімічною відповіддю, що виражається в активації комплементу, а також мобілізацією фагоцитів та активацією білкового синтезу, має місце підвищення рівня білків фракцій  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 глобулінів та фібриногену. Для хронічного запального процесу характерне зростання фракції  $\alpha$ -2 та, незначне,  $\beta$ -глобулінів. Крім того паралельно з підвищенням фракції  $\gamma$ -глобулінів знижується альбумінова фракція. Патологія печінки супроводжується порушеннями процесів білкового синтезу, і, як наслідок – зменшенням фракцій альбуміну та  $\alpha$ -глобуліну. Захворювання нирок можуть призводити до значних втрат альбуміну через порушення фільтраційної функції та зростання в плазмі крові високомолекулярних протеїнів, таких як макроглобулін, IgM, ліпопротеїни. При цьому відмічається значний спад альбумінової фракції на тлі збільшення рівня фракцій  $\alpha$ -1 та  $\alpha$ -2-глобулінів. Таким чином, зміни «протеїнового профіля» є маркером різних патологічних процесів.

Враховуючи наведене вище, актуальним є дослідження білкового складу сироватки крові та слизової оболонки стравоходу за експериментальної моделі ХОС, що сприятиме кращому розумінню метаболічних процесів, викликаних надмірною активацією протеолізу.

Електрофорез білкових фракцій сироватки крові контрольних щурів та тварин з модельованим ЛОС виявив наявність молекул від 15 до 168 кДа (табл. 4.3.2).

Таблиця 4.3.2

**Відносний вміст білкових фракцій у сироватці крові щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Білкові фракції М.м. кДа	Групи щурів з ХОС			
	КОНТРОЛЬ	7 доба	15 доба	21 доба
ЛОС				
168	86,8 ± 2,5	143,0±00,9*	190,2±0,2*	183,8±5,2*
150	156,7±3,7	219,9±11,4*	275,0±10,2*	320,7±19,6*
130	449,2±28,9	326,4±9,2	231,6±8,12*	73,2±7,4*
113	60,8±2,8	9,5±0,8	62,4±2,8*	30,6±1,4*
103	185,2±11,7	21,8±2,6*	33,7±1,7*	13,6±0,07*
89	126,0±9,1	6,2±0,2*	9,8±0,4*	5,02±0,1*
67	325,1±16,7	149,3±2,9*	173,0±16,9*	234,0±9,9*
55	221,0±9,7	57,4±1,8*	136,1±6,8*	128,2±4,2*
~40	145,0±0,9	40,0±0,6*	139,0±3,2*	40,0±0,8*
~25	79,8±3,1	77,0±2,6*	48,1±0,8*	18,0±0,1*
~15	74,5±1,9	68,3±1 *	20,2±0,1 *	69,81±0,9 *
КОС				
~168	86,8 ± 2,5	143,0±6,9*	80,8±3,8*	106,0±4,2*
~150	156,7±3,7	203,9±7,9*	247,0±8,1*	323,0±12,9*
~130	449,2±28,9	468,4±16,4	231,6±7,1*	115,9±3,2*
~113	60,8±2,8	58,5±2,3	69,4±2,8*	30,6±1,4*
~103	185,2±11,7	42,8±1,7*	25,7±1,0*	46,6±1,9*
~89	126,0±9,1	84,0±0,2*	98,0±0,4*	46,0±1,8*
~67	325,3±16,7	189,3±7,6*	216,0±16,9*	270,0±10,8*
~55	221,0±9,7	130,1±5,2*	97,8±3,9*	118,2±4,7*
~40	145,0±0,9	48,3±1,9*	37,2±0,6*	34,1±0,9*
~25	79,8±3,1	39,1±2,6*	20,3±0,4*	26,2±0,1*
~15	74,5±1,9	18,1±0,7 *	18,5±0,7*	21,2±0,8 *

За ЛОС було відмічено зростання рівня фракцій з М.м 168 та 150 кДа в усі терміни дослідження, максимальні показники виявлені на 21 добу – вдвічі вищі за контроль для обох зазначених фракцій.

Вміст фракції білків з М.м. 67кДа, що ймовірно відповідає альбуміну, за ЛОС знижувався в усі терміни дослідження. Найменший показник виявлений на 7 добу - на 54% менше за контроль. Зниження рівня альбумінів може відбуватись через збільшення проникності судинної стінки, а також через порушення функції печінки – головного органу, в якому синтезуються альбуміни [403].

Зміни вмісту низькомолекулярних фракцій – з М.м. 55; 40; 25 та 15кДа – за ЛОС носили різноспрямований характер. Наприклад, було встановлено зменшення фракції з М.м. 40 кДа на 7 та 21 добу за ЛОС втричі, порівняно з контролем. А вміст фракції з М.м. 25 кДа знижувався на 15 та 21 добу за ЛОС відповідно в 1,7 та 4,4 рази, порівняно з контролем.

Таким чином, в моделі ЛОС було показано зміни білкового складу в сироватці крові, що виражались у збільшенні фракції, яка імовірно відповідає гамма-глобуліновій, та зменшенні фракції, що може відповідати альбуміновій.

В моделі КОС електрофорез білкового складу сироватки крові також виявив кількісні зміни вмісту різних білкових фракцій. Зокрема, виявлено збільшення рівня фракції з М.м. ~168 кДа на 7 та 21 добу за КОС відповідно в 1,7 та 1,2 рази відповідно, та зниження даного показника на 15 добу у 1,1 рази. Також показано зростання вмісту білкової фракції з М.м. ~150 кДа на 7, 15 та 21 добу за КОС відповідно в 1,3; 1,6 та 2,1 рази, порівняно з контролем. Зазначені фракції білків сироватки крові імовірно відповідають фракції імуноглобулінів. Згідно окремих літературних джерел, рівень імуноглобулінів зростає в перші тижні опікової хвороби. За даними інших дослідників, навпаки, опікова хвороба може викликати тривале зменшення вмісту імуноглобулінів в крові [188,189].

Нами було також показано зниження рівня фракції білків М.м. ~ 130 кДа на 15 та 21 добу за КОС відповідно у 2 та 4 рази, порівняно з контролем. Зазначена фракція може відповідати білка гострої фази церулоплазміну,

концентрація якого в крові зростає за умов запалення, інфекції чи тривалій травматизації [190].

Виявлене збільшення вмісту фракції з М.м.  $\sim 113$  кДа, яка імовірно відповідає С-реактивному білка, на 15 добу за КОС у 1,2 раза, може бути свідченням протікання гострої фази запалення [402].

Також було встановлено істотне зменшення рівня білків з М.м  $\sim 103$  та  $\sim 89$  кДа за КОС. Зазначені фракції можуть відповідати білкам гострої фази гаптоглобіну ( $\sim 103$  кДа) та плазміногену (89 кДа). Рівень гаптоглобіну у крові виступає індикатором маркером гемолізу еритроцитів. Так, руйнування еритроцитів та вивільнення гемоглобіну супроводжується зменшенням концентрації гаптоглобіну. Зниження вмісту плазміногену може пояснюватись його за діянням у вторинному фібринолізі, що запускається у відповідь на внутрішньосудинне згортання крові за КОС [402].

Дослідження вмісту альбумінової фракції ( $\sim 67$  кДа) виявило його зменшення на 7 та 15 доби експерименту у 1,7 та 1,5 раза, відповідно, що може свідчити про порушення функціонування печінки, нирок або інших органів [415].

Також виявлено зниження вмісту преальбумінової фракції з М.м  $\sim 55$  кДа протягом всього експерименту, в середньому у 1,9 раза, порівняно з контрольними значеннями. Концентрацію преальбуміну або транстиретину в крові в клінічній практиці аналізують при захворюваннях печінки, опіках та запальних процесах. Також рівень пре альбуміну виступає важливим показником для оцінки білково-енергетичної недостатності, що супроводжує критичні стани [415].

Щодо інших досліджуваних фракцій білків – було виявлено зниження їх вмісту в сироватці крові протягом усього експерименту за КОС. Зокрема, вміст фракції з М.м.  $\sim 40$  кДа зменшувався у 3-4 раза; фракцій з М.м.  $\sim 25$  кДа – знижувався у 2- 4 раза; фракції з М.м  $\sim 15$  кДа – спадав у 1,4- 4 раза, порівняно з контролем. Фракція з М.м.  $\sim 40$  кДа можемо припустити, що

відповідає  $\alpha$ -1-кислому глікопротеїну, а фракція з М.м.~ 25 кДа – знову можемо припустити, що  $\alpha$ -1-мікроглобуліну. Вище вказані білки синтезуються в печінці, тому зниження вмісту вказаних фракцій може бути результатом порушення роботи даного органу. Фракція з М.м ~15 кДа може імовірно відповідати лізоциму, який виступає фактором неспецифічної резистентності, антибактеріальним ферментом, таким чином, зменшення його вмісту відбувається за складних опіків та травм, та при хронічній стадії запального процесу за рахунок недостатності фагоцитозу [330].

Отже, можна узагальнити, що аналіз розподілу білків у сироватці крові щурів за умов ХОС виявив зниження рівня альбумінової фракції на тлі підвищення вмісту глобулінової фракції.

Опікові травми викликають численні молекулярні зміни не лише в області рани, а на рівні всього . По місцю локалізації хімічної травми інтенсифікуються процеси синтезу та деградації білків. Аналіз літературних даних показав, що молекулярні механізми процесу загоєння післяопікових ран вивчені недостатньо, оскільки роботи зосереджені переважно на дослідженні ролі окремих білків у рановому процесі [372,373]. Тому певний теоретичний та практичний інтерес становить дослідження білкових фракцій слизової оболонки стравоходу після ХОС, що може відкрити нові перспективи для лікування опікових ран та профілактики рубцювання.

Електрофоретичний аналіз білкового складу в слизовій оболонці стравоходу експериментальних тварин контрольної групи та в моделі ЛОС присутність білкових фракцій з М.м. від 34 до 126 кДа (табл. 4.3.3). Достовірних змін якісного складу білків у слизовій оболонці стравоходу в ході досліджень виявлено не було. Проте, слід відмітити кількісні зміни. На відміну від показників у сироватці крові дослідних щурів, для слизової оболонки стравоходу характерна одно напрямленість змін.

Таблиця 4.3.3

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

Білкові фракції	Групи щурів з ХОС				
	М.м.(кДа)	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба
ЛОС					
~126	4,7 ± 0,19	3±0,07*	12,6±2,1*	3,9±1,0	2,9±0,12*
~90	0,8 ± 0,02	1,1±0,03*	1,7±0,6*	1,12±0,05*	1,01±0,19
~74	5,8 ± 0,12	18,5±1,2*	8,7±0,4*	6,3±0,23*	4,1±0,15*
~55	8,9 ± 0,33	4,2±0,2*	3,5±0,05*	16,3±0,8	7,3±1,2
~52	2,9 ± 0,11	4,2±0,6*	3,6±0,6	7,38±0,2	5,1±0,4*
~34	3,7 ± 0,13	7,01±0,6*	6,17±0,4*	12,38±1,3	11,4±0,9*
КОС					
~126	4,79±0,1	2,13±0,1*	5,00±0,1	2,37±0,1*	5,39±0,1*
~110	3,45±0,1	1,93±0,1*	4,87±0,1*	3,57±0,1	3,50±0,1
~87	8,97±0,2	2,01±0,1*	7,20±0,2*	8,39±0,2*	8,56±0,2
~74	5,87±0,1	6,13±0,2	17,8±0,5*	2,79±0,1*	2,52±0,1*
~55	4,54±0,1	2,67±0,1*	8,44±0,3*	8,13±0,2*	4,51±0,1
~52	2,91±0,1	1,85±0,1*	4,93±0,1*	7,75±0,2*	6,47±0,2*
~34	3,70±0,1	3,23±0,1*	16,9±0,5*	5,35±0,1*	8,18±0,2*

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

Так, нами було виявлено збільшення вмісту фракції з М.м. ~ 74 кДа на 1 добу у 3,1 раза за ЛОС. В подальші терміни експерименту рівень даної фракції поступово знижувався до контрольних значень. Ми припускаємо, що фракція з М.м. ~ 74 може відповідати білку теплового шоку Hsp70. Згідно літературних джерел відомо, що вміст зазначеного білка залежить від ступенем опіку. Фізіологічна роль Hsp70 вивчалася на у численних моделях зокрема таких, як гіпертермія, гіпертензія, гіпоксія, ішемія, запалення, аутоімунні патології, апоптоз, злоякісні пухлини, а також після контакту клітин з хімічними речовинами. Зростання рівня Hsp70, можна пояснити здатністю зазначених білків зв'язувати денатуровані білки, пошкоджені в

результаті деструктивної дії лужних речовин, та захистом процесів біосинтезу білків. Фракція з М.м ~ 90кДа може відповідати ще одному білку теплового шоку - Hsp90. За ЛОС вміст даної фракції максимально зростав на 7 добу у 2,1 раз, порівняно з контрольними значеннями. В подальші термінах експерименту даний показник поступово зменшувався. З літературних джерел відомо, що загальний рівень даного білка є 1-2%, збільшується за умов дії стресових факторів. Отримані результати щодо підвищення вмісту Hsp70, Hsp90 білків вказують на підтримку клітинного гомеостазу [372-377].

Фракція з М.м. ~55 та 52 кДа за ХОС на 15-ту добу експерименту: виявлено збільшення даних показників відповідно в 1,8 та 2,5 раз, порівняно з контролем. Фракції з М.м. ~ 52 кДа та 55 кДа Імовірно відповідають білкам кератинам [182,183]. На 15-ту добу спостерігали зростання вмісту фракцій з М.м. ~50 та ~58 кДа – може вказувати на епітелізацію опікової рани. Фракція з М.м ~34 кДа - може відповідати - фактору росту. ендотелію судин [377-378].

За умов КОС процеси дегградації білків також досліджували у слизовій оболонці. Досліджень присвячених визначенню білкового складу слизової стравоходу за умов ХОС досить мало. Слизова оболонка стравоходу має багато глікопротеїни у своєму складі. Кератин – це білків плоского епітелію, серед структурних виділяють (кератин 4, кератин 6, кератин 13 і кератин 32), також відомі такі, як кальцій зв'язуючі білки, корнулін і S100A14, їх функції полягають в тому, що вони забезпечують структурну цілісність клітин. В епітелії слизової оболонки секретуються: кератин 13, муцин 21. Муцин збагачений ферментом алкогольдегідрогеназою-7 [191].

Як зазначалось вище, аналіз електрофореграм білків слизової оболонки стравоходу щурів виявив наявність фракцій з М.м. від 34 до 126 кДа.

За умов КОС у тканинах стравоходу виявлено зменшення вмісту фракцій з М.м. ~126 кДа на 1 та 15 добу відповідно в 2,3 та 2 раз, порівняно

з контролем, вміст даної фракції зростав на 7 та 21 добу у 1,1 раза. Дана фракція ~126 кДа може відповідати центросомним білкам. Центросомні білки мають важливе значення в базових клітинних функціях(ділення, транспорт). Зміни вмісту даної фракції, можуть вказувати на пошкодження тканин, або їх загоєнням. Варто зазначити, що центросомних білків відносяться (цетрин, глобулін, тубулін, р53, шаперони).

Вміст фракції з М.м. ~110 кДа зменшувався на 1 добу після КОС у 1,8 раза порівняно з контролем. На 7 добу даний показник, навпаки, перевищував контроль у 1,4 раза, на 15 та 21 доби - знижувався до контрольних значень. Подібна динаміка змін була відмічена і спостерігалась для фракції з М.м. ~87 кДа. На 1 добу після КОС відбувалось суттєве зниження її вмісту у 4,5 раза, на 7 добу показник був нижче контрольного значення у 1,3 раза, а на 15 та 21 добу – зростав до рівня контрольних значень.

Для фракції з М.м. ~ 74 кДа було показано істотне збільшення на 7 добу за КОС - у 3 рази вище контролю. На 15 та 21 добу показник, навпаки, різко знижувався – відповідно у 2,1 та 2,4 раза нижче контролю.

Фракція з М.м. ~110 кДа імовірно відповідає - білку теплового шоку Hsp 110. Фракція з М.м. ~87 кДа - Hsp 90, а фракція з М.м. ~ 74 кДа – Hsp70. Hsp 110 згідно літературних даних, вважають прогностичним фактором при меланомі, раку шлунку чи стравоходу. Hsp 90 - має важливу роль за протеолітичної деградації. Hsp 70 - може корелювати із ступенем опіку [149, 150].

Фракція з М.м. ~110 кДа імовірно відповідає - білку теплового шоку Hsp 110. Фракція з М.м. ~87 кДа - Hsp 90, а фракція з М.м. ~ 74 кДа – Hsp70. Hsp 110 згідно літературних даних, вважають прогностичним фактором при меланомі, раку шлунку чи стравоходу. Hsp 90 - має важливу роль за протеолітичної деградації. Hsp 70 - може корелювати із ступенем опіку [149, 150].

При аналізі електрофореграм білків у тканинах слизової оболонки стравоходу за КОС виявив зміни вмісту фракцій, а саме: фракції з М.м. ~55 на 7 та 15 добу у 1,9 та 1,8 раза відповідно, тоді як на 1 добу цей показник був нижче контролю у 1,7 раза; фракції з М.м. ~ 52 кДа на 7, 15 та 21 доби у 1,7; 2,7 та 2,2 раза, відповідно, на 1 добу даний показник був нижче контрольного рівня у 1,6 раза.

Існує два типи кератинів: I тип - з М.м. ~40-55 кДа, II тип - М.м. ~56-70 кДа. Кератин-4 (57кДа) та кератин-13 (48 кДа) експресуються в епітелії слизової оболонки стравоходу. Зниження кератину-4 пов'язують з карциномою голови, раку стравоходу. Кератин-6 (59 кДа) бере участь у загоєнні ран, має значення в проліферації. Кератин-17 (48 кДа) приймає участь у загоєнні. Кератин-5 (58 кДа) та кератин-14 (50 кДа) - реепітелізації ран, підвищення може свідчити про епітелізацію опікової рани фракція з М.м. ~ 34 кДа може відповідати факторам росту фібробластів, на 7, 15 та 21 добу зростала за КОС - відповідно у 4,6; 1,5 та 2,2 раза. [416, 417].

Метод електрофорезу дозволяє розділити білки на основні фракції, такий метод дозволяє зробити якісну оцінку білкового складу тканин за ХОС. оскільки будь-яка хвороба супроводжується змінами білкового складу організму. За умов ХОС були показані зміни вмісту білкових фракцій в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу.

Проведений аналіз ензимограми слизової за умов ЛОС, який вказує на наявність білкових фракцій з М.м. 92 та 20 кДа (рис. 4.3.3).

Фракція з М.м. 92 кДа, ймовірно, є ММП-9. Отримана фракція відноситься до класу желатиназ. ММП-9 має впливає на денатуровання колагену. Досліджувана фракція здатна розщеплювати нативний колаген. ММП-9 володіє властивостями: розщеплення ці молекули, та сприяє зниженню/підвищенню їх біологічну активність [383, 418]. Було показано присутність у слизовій оболонці стравоходу фракції, що імовірно відповідає ММП-9, в усі досліджувані терміни за умов ЛОС та її відсутність у контролі

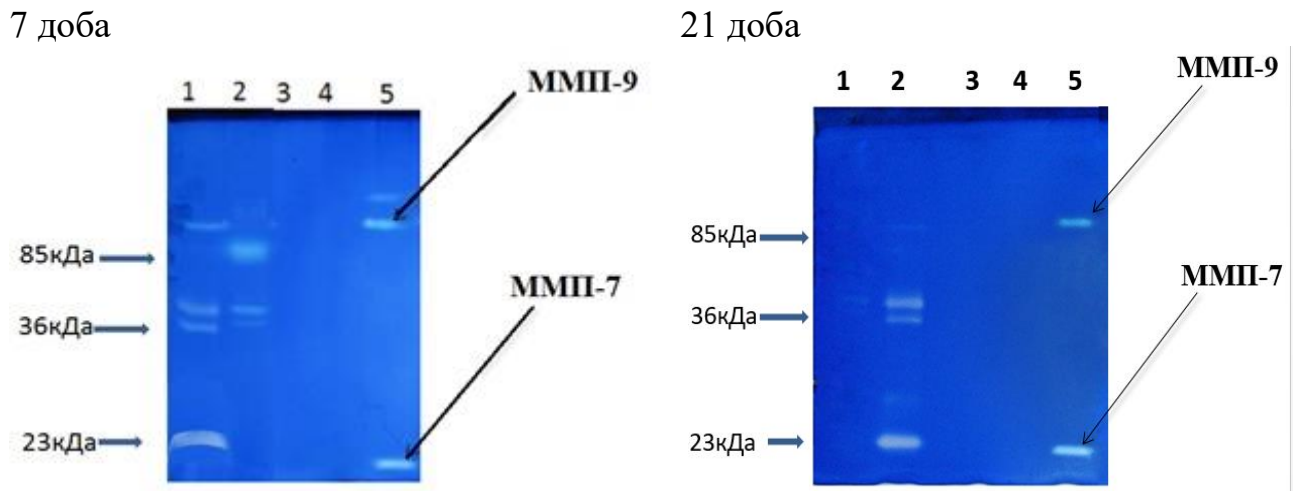


Рис. 4.3.3 Ензимограма матричних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу; (М±m, n=8); 1, 2-маркери; 3,4-контроль; 5- ЛОС

Виявлена фракція на ензимограмі з М.м. 28 кДа, може відповідати ММП-7, є матрилізином. Дана металопротеїназа є однією з найменших металопротеїназ, що складається з про-домену та каталітичного домену. ММП-7 експресується в нормі та за патологічних умов. Літературні та експериментальні дані вказують на те, що ММП-7 є одним з прогностичних маркерів ракового переродження тканин стравоходу. Дослідження, які ми провели в них було показало, що при зляккісному переродженні клітин стравоходу експресія та активність ММП-7 підвищується [214, 215, 216].

Дані, які ми отримали можуть вказують на те, що за умов ХОС відбувається порушення протеїназно-інгібіторного комплексу в плазмі крові. Відмічено підвищення протеолітичної активності ферментів та їх інгібіторів протеїназ. Було показано зростання плазміну, що вказує на надмірну активацію.

Продукти деградації білків з молекулярною масою 0,3-5 кДа накопичуються у результаті активації протеолізу в пошкоджених тканинах та

в крові. У літературі продукти протеолізу такого діапазону М.м. називають МСМ. За хімічним складом МСМ є вкрай неоднорідними і складають гетерогенну групу речовин. До неї належать пептиди, ендорфіни, аміноцукри, поліаміни, глікопептиди, нуклеопептиди, багатоатомні спирти. До складу цієї гетерогенної групи також входять гуморальні регулятори (інсулін, глюкагон, деякі вітаміни, нуклеотиди, олігосахариди, похідні глюкуронових кислот і інші.)

Показник МСМ відображає рівень патологічного білкового метаболізму. МСМ є своєрідним біохімічним маркером. МСМ діляться дві групи - речовини середньої молекулярної маси та олігопептиди. До першої групи відносять небілкові похідні різної природи, що накопичуються в організмі в концентраціях, що перевищують норму. До другої відносять – олігопептиди (ОП) - представлена речовинами пептидної природи, які виконують регуляторні і нерегуляторні функції [194].

Загальновідомо, що рівень МСМ варіює залежно від метаболічного стану організму. Показник МСМ певною мірою є прогностичним показником, який характеризує порушення при обмінних процесах. накопичення МСМ не просто виступає маркером ендоінтоксикації, в подальшому вони здатні посилювати патологічний процесу. Молекули здатні набувати ролі вторинних токсинів [151].

За умов моделювання КОС та ЛОС нами було визначено вміст МСМ в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів (рис. 4.3.4, 4.3.5.) та (табл.4.3.4.)

За умов ЛОС на 7 добу, було виявлено зростання концентрації МСМ на 42%, в сироватці крові, а в слизовій стравоходу підвищення концентрації було на 28%, порівняно з контрольними значеннями.

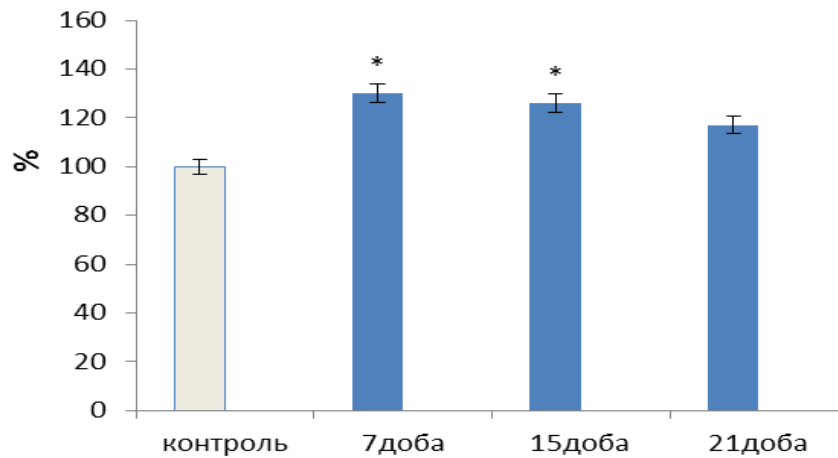


Рис. 4.3.4. Вміст молекул середніх мас у сироватці крові щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Нами було визначено вміст МСМ в сироватці крові щурів [195] за умов КОС було показано підвищення рівня МСМ в сироватці крові щурів на 1 та 7 добу відповідно в 1,2 та 1,1 раза. Тоді як на 15 і 21 добу, навпаки, спостерігалось зниження показника відповідно у 1,3 та у 1,2 раза, відповідно. Зростання вмісту МСМ може бути викликано дією протеолітичних ферментів, що впливає на вихід неспецифічних токсичних продуктів з клітини у великій кількості.

Таким чином, зниження вмісту МСМ, на початкові терміни експерименту може вказувати на вихід токсинів через судинне русло із організму. В кінцеві терміни зниження вмісту МСМ може вказувати на епітелізацію рани.

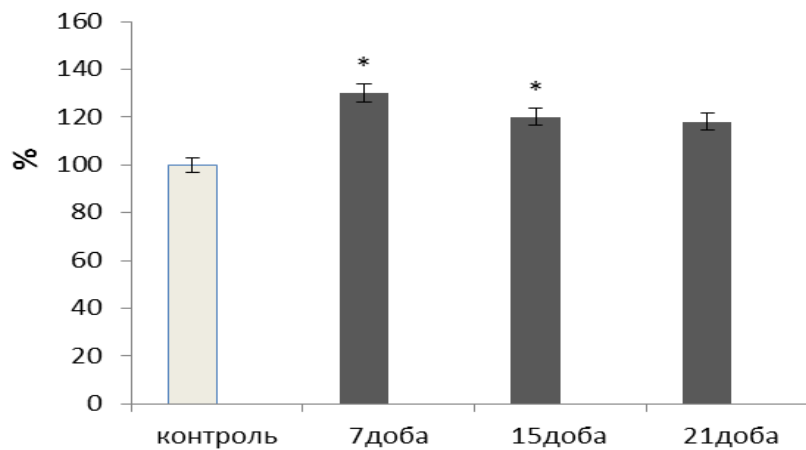


Рис. 4.3.5. Вміст молекул середніх мас у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Дослідження вмісту МСМ у слизовій оболонці стравоходу за умов КОС виявило його зниження на 1 добу експерименту у 1,3 раза, порівняно з контролем. В подальші терміни концентрація МСМ в тканинах стравоходу поступово зростає, проте залишається нижче контрольного рівня, і лише на 21 добу переважає контроль у 1,2 раза [196].

Таблиця .4.3.4

**Вміст молекул середніх мас у сироватці крові та слизовій оболонці  
стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу  
( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Групи щурів з ХОС				
	Контроль	7 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
МСМ (ум.од./мл)	0,24±0,01	0,28±0,01*	0,29±0,01*	0,19±0,01*	0,21±0,01
Слизова оболонка стравоходу					
МСМ (ум.од./мг білка)	0,21±0,01	0,14±0,01*	0,16±0,01*	0,19±0,01	0,23±0,01

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

Зростання рівню досліджуваного показника може вказувати на мікробну інтоксикацію, а також може збільшуватись внаслідок деструкції тканин. При ензимній інтоксикації рівень молекул може бути в межах норми, за рахунок високої активності протеїназ. [194]. Згідно літературних даних підвищення рівня МСМ у крові спостерігається при численних патологічних станах різної етіології: сепсисі, опіковій хворобі, травмах та інших [197].

За умов моделювання КОС та ЛОС в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів було визначено вміст олігопептидів (ОП) (табл.4.3.5.).

Таблиця 4.3.5

**Вміст олігопептидів (ОП) у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
ОП (ум.од./мл)	ЛОС	0,17±0,01	0,31±0,03*	0,15±0,02*	0,17±0,03
	КОС	0,24±0,01	0,29±0,01*	0,26±0,03*	0,20±0,01*
Слизова оболонка стравоходу					
ОП (ум.од./мг білка)	ЛОС	0,15±0,01	0,18±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01
	КОС	0,16±0,01	0,21±0,03*	0,26±0,03*	0,16±0,01

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

В експериментальній моделі КОС визначали вміст олігопептидів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів. У сироватці крові станом на 7 добу експерименту було виявлено зростання ОП у 1,3 раза відносно контролю. В подальші терміни експерименту відзначали тенденцію до зниження концентрації олігопептидів. І тільки в кінцеві терміни станом на 21 добу за КОС рівень олігопептидів був нижчим за контроль у 1,2 раза. За умов КОС у слизовій оболонці стравоходу відмічали зміни вмісту ОП.

Станом на 7 добу за КОС вміст ОП був нижчим у 1,3 раза за контроль. На 7 та 15 доби спостерігалось підвищення вмісту показника у 1,3 та 1,6 раза, відповідно порівняно з контрольною групою. На 21 добу вміст ОП знизився до контрольного рівня. Отже, в результаті дослідження ХОС встановлено підвищений рівень ОП у сироватці крові та у слизовій оболонці стравоходу.

За умов ЛОС концентрація ОП зростала на 7 добу у сироватці крові на 82% , слизовій стравоходу на 34,6%, порівняно з контрольною групою.

Вміст олігопептидів у сироватці крові та слизовій стравоходу корелює з загальним вмістом МСМ на 1 та 7 добу після опіку. Подібна відповідність не спостерігається на 15 добу для сироватки крові та на 21 добу для слизової оболонки стравоходу. В ці терміни відмічено підвищення активності деяких ММП, можливо в цей час відбувається утворення МСМ з перевагою речовин середньої молекулярної маси - небілкових похідних різної природи.

Таким чином, дані, які ми отримали, вказують на зростання активності ферментів протеолітичної системи та накопичення продуктів деградації, що призводить до таких наслідків, як: інтоксикація організму, гіпоксія, розлад гемодинаміки. МСМ є токсичними субстратами, їх функція полягає здатності з'єднуватися з рецепторами будь-якої клітини та блокувати, а також впливати на метаболізм.

Система комплементу - одна з найважливіших захисних систем організму. Основною функцією системи комплементу яка характеризується виділенням відразу після активації системи комплементу компонентів, що вкривають патогенні організми чи імунні комплекси, посилюючи при цьому процес фагоцитозу. Другою важливою функцією є участь у запальних реакціях. Третя функція системи комплементу - цитотоксична. Надалі було виявлено й інші біологічні функції цього фактора, який пізніше назвали комплементом, зокрема активацію фагоцитозу за рахунок опсонізації, вивільнення з гранул тканинних базофілів (лаброцитів) таких біологічно активних амінів, як гістамін, серотонін, брадикінін, а також участь у розвитку

запальних реакцій і, нарешті, індукція підвищення проникності клітинних мембран, зниження судинного тону, позитивний хемотаксис, імунне прилипання й інші феномени.

Таким чином, система комплементу - це комплекс білків сироватки крові, здатних до самоорганізації й опосередкування реакцій гуморального імунітету і фагоцитозу. Компоненти комплементу циркулюють у крові в неактивному стані. Активація системи комплементу може здійснюватися двома шляхами - класичним, або імунним, і альтернативним, або пропердиновим. Система комплементу належить до однієї з систем протеолізу. Вона починає активуватись під дією продуктів імунної відповіді. Активаторами шляху комплемента є комплекси антиген-антитіло, які, зв'язуються з сериною протеїназою, активують її В основі патогенезу опікової хвороби лежать складні механізми адаптації і дезадаптації, які впливають на всі рівні регуляції і гомеостазу. Одним з провідних компонентів цих процесів є порушення в системі імунітету. Опік можна віднести до комбінованого імунодефіцитного стану, з схильним до затяжного і хронічного перебігу. Також, варто відмітити, що у під час опіку зростає вміст мікробних і змінених антигенів власних тканин, таким чином іде формування аутосенсibiliзації [65, 182].

У роботі ми визначали вміст імуноглобулінів класу G у сироватці крові, оскільки вони мають важливе значення в захисті від інфекцій, забезпечуючи пасивний імунітет [197].

Було показано зростання вмісту IgG за умов ЛОС на 21 добу на 126,7% , порівняно з контролем (рис. 4.3.6).

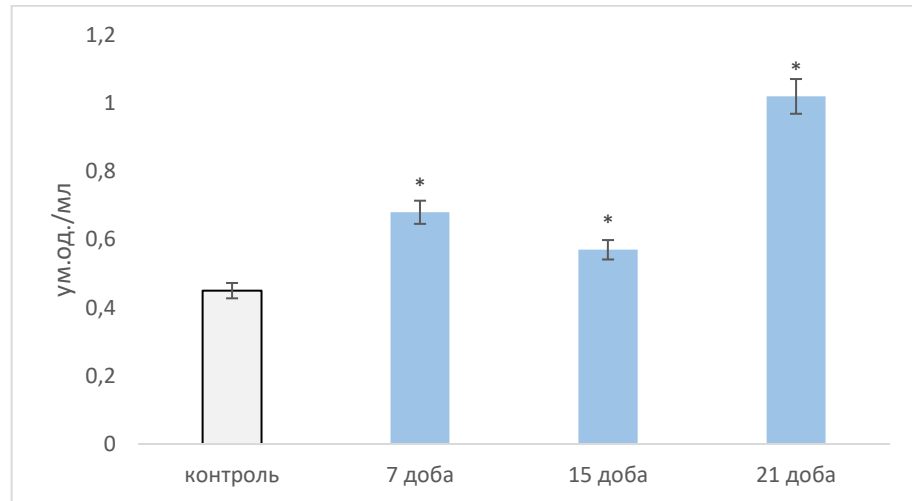


Рис. 4.3.6. Вміст IgG у сироватці крові щурів (у.м.од./мл) за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Зростання концентрації на 21 добу може вказувати на хронічний запальний процес за опіку стравоходу.

За КОС також було показано підвищення рівня IgG у 1,5 раза на 21 добу, що свідчить про хронічний запальний процес при опіку стравоходу (рис.4.3.7).

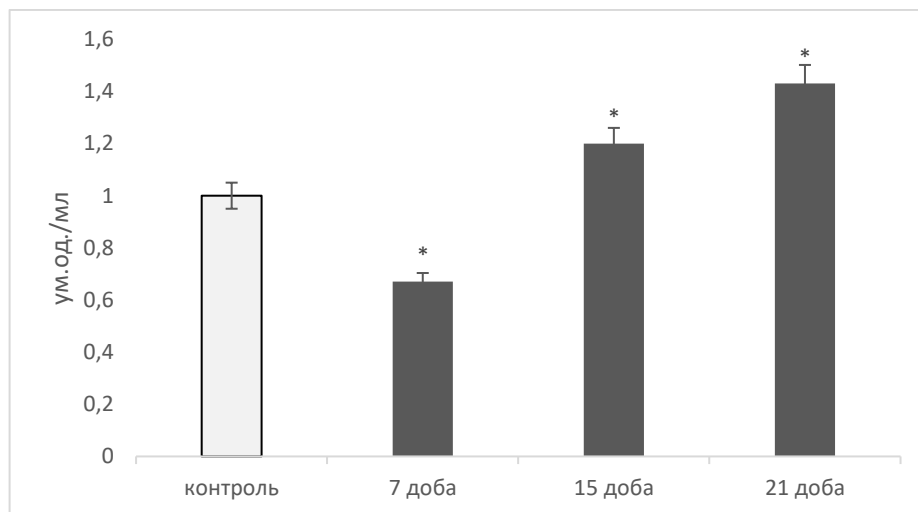


Рис. 4.3.7. Вміст IgG у сироватці крові щурів (у.м.од./мл) за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

У пацієнтів з обширними опіками рівень імуноглобулінів може зменшуватись через прискорення їх елімінації. Це може бути пов'язано з підвищений катаболізм і втрату сироваткових імуноглобулінів через рани. Такі умови роблять організм дуже чутливими до інфекцій. Інфекція є частою причиною смерті за даної патології. Виявлені нами зміни вмісту IgG можуть бути пов'язані із порушенням білкового обміну за ХОС, як показано раніше. Також, як було виявлено раніше ХОС супроводжувався зростанням лейкоцитів та зниженням нейтрофілів в цей період часу [200].

Згідно літературних даних, в стадії шоку за опіку стравоходу спочатку відбувається зниження рівню IgG. В стадії токсемії і септикотоксемії концентрація IgG починає зростати. Таким чином, підвищення у крові рівня імуноглобуліну G може свідчити про розвиток хронічного інфекційного процесу в організмі [190, 199].

Можна зазначити, що дані, які ми отримали як і більшість літературних даних мають дещо різнонаправлений характер. Одні дослідження показали зростання концентрації усіх класів імуноглобулінів. Інші вчені вказують на спад рівня імуноглобулінів класів M, G, A. Протиріччя можуть бути пояснені індивідуальною чутливістю, а також глибиною опікової травми [205, 206]. З причини таких різнонаправлених пояснень, ми обрали ще один метод (більш достовірний, на нашу думку). Для визначення IgG були виділені фракції IgG методом афінної хроматографії з сироватки крові щурів, яким було експериментально змодельовано ХОС (рис.4.3.8).

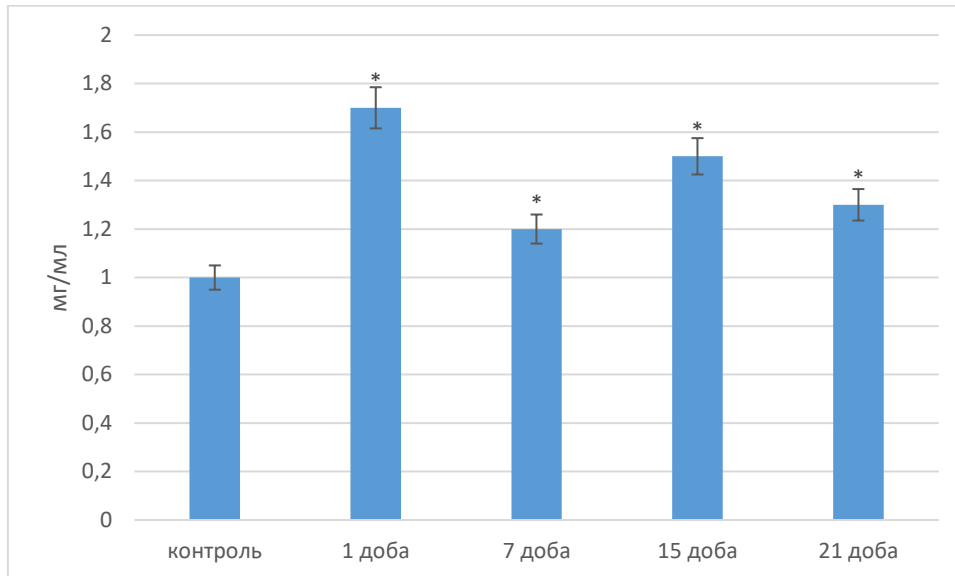


Рис. 4.3.8 Концентрація IgG у сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем )

В результаті досліджень встановлено різке підвищення концентрації IgG за умов ЛОС на 1 добу в 1,7 раза, порівняно з контрольними значеннями. На 7-му добу експерименту рівень антитіл дещо знижувався, проте залишався вище контрольних значень. На 15 добу за ЛОС рівень IgG перевищував контроль в 1,4 раза. На 21 добу досліджуваний показник знижувався, проте залишався вище контрольних значень.

Ми припустили, що IgG може індукувати активацію тромбоцитарної ланки гемостазу. При опіках важливу роль відіграють тромбоцити. Тромбоцити вивільнюють медіатори запалення, експресують прозапальні молекули. Таким чином, наслідком активації тромбоцитів є вивільнення медіаторів запалення [209].

Для досліджень ми отримували плазму крові, збагачену тромбоцитами. За ЛОС із сироватки крові щурів методом хроматографії виділяли загальну фракцію антитіл класу G, а також визначали їх вплив на секрецію білків тромбоцитів.

Виявлено, що в контролі АТ впливали на вивільнення з тромбоцитів одинадцяти компонентів. Молекулярна маса їх була близько 250 кДа (рис. 4.3.9).

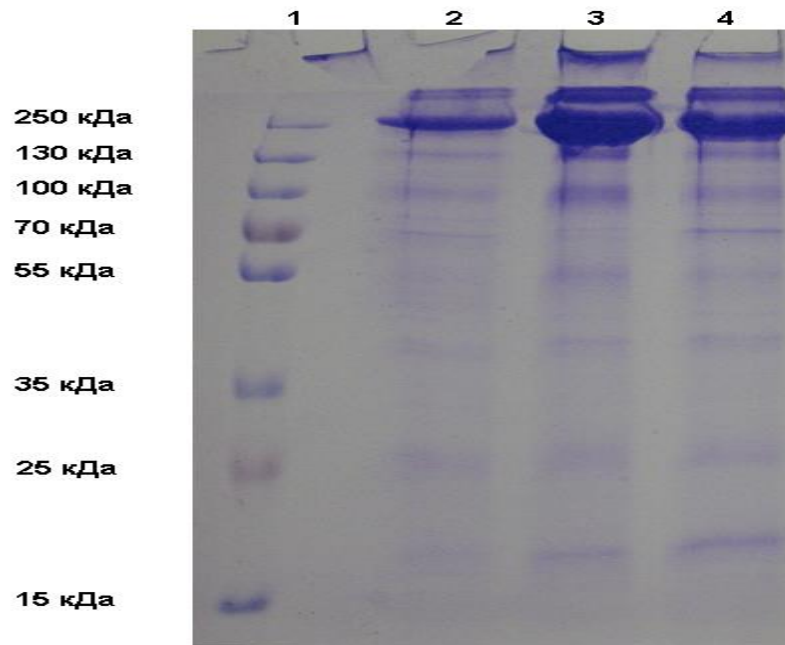


Рис. 4.3.9. Електрофореграма середовища інкубації тромбоцитів щурів з IgG: 1 – маркери; 2– контрольних щурів; 4– щурів з опіком стравоходу.

АТ щурів за лужного опіку викликали секрецію білків і вона була вищою за контроль у 1,5 раза. Показано зростання вмісту компонентів з М.м. в районі 400 - у 2,2 раза; 350- 2,7 раза та 250 кДа –у 1,4 раза, відповідно. Відмічали зростання секреції компонента з м.м. 50 кДа –у 6 раз.

IgG щурів за лужного опіку сприяли посиленню секреції білка з М.м. 70 кДа та порівняно контролем IgG. Відмічено, що білок з М.м 70 кДа секретувався у 2,7 раза швидше, білок з М.м 20 кДа компонент –у 6 раз .. Таким чином, найінтенсивніша секреція компоненту 70 кДа була за умов АТ за ЛОС. Компонент з М.м 70 кДа може відповідати білку теплового шоку (hsp 70) [210].

Методом вестерн-блоту було визначено вплив IgG за лужного опіку на секрецію інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (РАІ-1).

Було показано, на блотограмі у контролі - 7 форм інгібітору (рис.4.3.10).

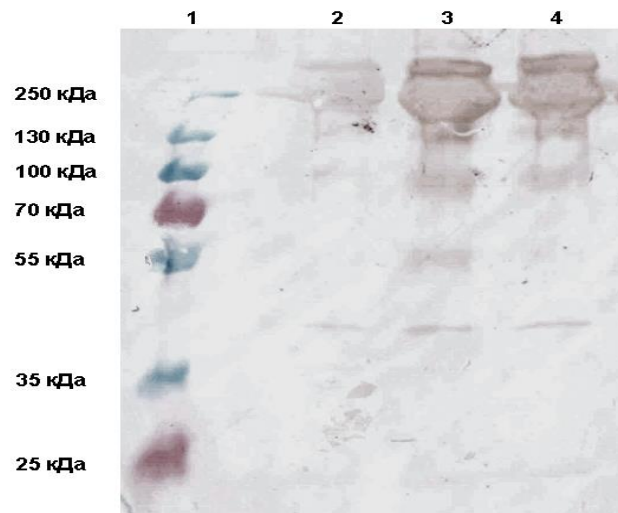


Рис. 4.3.10. Блотограма середовища інкубації тромбоцитів щурів з IgG: 1 – маркери; 2– контрольних щурів; 4 – щурів з хімічним опіком стравоходу.

АТ, які з'явилися за опіку викликали посилення секреції РАІ-1 в у 3,4 раза порівняно з контрольними значеннями. Комплекси з М.м 400, 350, 250 та 140 кДа вивільнялись найбільш інтенсивно. Була виявлена смуги в районі 50 кДа, яка ймовірно відповідає - РАІ-1. Також була виявлена суга з М.м 100 кДа, яка ймовірно може бути - РАІ-1 з урокіназою. АТ щурів за лужного опіку впливали на зростання даного інгібітору. Інтенсивне утворення спостерігали - 20 кДа за IgG ЛОС.

Таким чином, АТ IgG щурів з лужного опіку впливали на посилення секреції на 60%, порівняно з контрольною групою. АТ IgG за ЛОС, сприяли секреції білка з М.м 70 кДа, а також впливали та низькомолекулярних

компонентів. IgG викликав посилення секреції PAI-1 майже у чотири рази порівняно з контролем.

Таким чином, хімічний опік стравоходу проходить з великими змінами в гуморальній ланці імунної системи та появою в кровотоці аутоантіліл на що вказує підвищення вмісту IgG. Також результати досліджень можуть свідчити про вплив IgG з сироватки крові щурів з опіком стравоходу на функціональну здатність тромбоцитів.

Отже, ХОС характеризувався вираженим і тривалим підвищенням IgG, дані зміни можуть говорити про розвиток запального процесу. Також, такі зміни свідчать про утворення гранульованої тканини. Формування рубця, розвиток поліорганної недостатності, порушення регенерації та уповільнення загоєння це все є наслідком запалення за опіку стравоходу.

Із застосуванням хроматографічного методу нами було отримано фракцію серинових ферментів та показано найбільш виражене зростання концентрації серинових ферментів у плазмі крові на 7 добу за умов ЛОС. Аналіз якісного складу серинових ферментів виявив утворення великої кількості деградованих форм плазміну.

Була показана наявність нейтрофільної еластази, що свідчить про активний процес загоєння. Нами був визначений відносний вміст білкових фракцій у сироватці за ХОС. В обох експериментальних моделях було показано зростання вмісту глобулінової фракції, та зниження альбумінової. Також нами був визначений якісний вміст білкових фракцій у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС та КОС. Було показано наявність низькомолекулярної фракції, що свідчить про активацію протеолітичної системи.

При визначенні вмісту молекул середніх мас у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за ХОС, було показано підвищення даного показника переважно на 7 добу досліджень. При аналізі ензімограми у слизовій оболонці стравоходу нами була виявлена фракція, яка може

відповідати ММП-7, що може бути прогностичним маркером злоякісного переродження тканин стравоходу. Дослідження рівня IgG в сироватці крові тварин хроматографічним та імуноферментним методом виявило підвищення IgG. Слід відмітити, що подібна тенденція прослідковувалась в обох експериментальних моделях – лужного і кислотного опіку стравоходу. Отже, за умов зростання активності протеолітичних процесів відбувається утворення нетипових білкових форм, що на тлі зростання оксидативного стресу та запальних процесів можуть обтяжувати регенераційні процеси.

## РОЗДІЛ 5

### МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

#### 5.1 Процеси загоєння за умов хімічного опіку стравоходу.

У першій частині нашої роботи було проведено дослідження біохімічних параметрів, стану АОС, дослідження імунної відповіді, внаслідок хімічних опіків. Наступним етапом нашої роботи було підтвердження наявності запальних процесів на молекулярному рівні та активацію молекул на рівні експресії гена.

Циклооксигенази (Cox) та ендопероксид синтаза простагландину (Ptgs) продукують простагландини, які грають суттєву роль у тонусі судин, тромбозі, запаленні та болю. Ферменти циклооксигенази є терапевтичною мішенню протизапальних засобів, мають важливу роль у лікуванні запалення. Ptgs розрізняють дві форми: Ptgs 1 є конститутивною ізоформою, Ptgs2 індукбельною та активується після запалення. Було встановлено, що транскрипція Ptgs2 ініціюється транскрипційними факторами, такими як: NF-κB, AP-1, Sp1 та C / EBP. Також було показано, що Ptgs2 кодує циклооксигеназу два – це фермент який, відповідальний за створення простагландину E2 з арахідонової кислоти. Він також бере участь у таких біологічних процесах: метаболізм ЖК, жировий обмін, конверсія жирних кислот, синтез ліпідів, біосинтез та метаболізм простагландинів [163-169].

Визначали рівень експресії генів Ptgs2 в слизовій оболонці стравоходу та сироватки крові в умовах ЛОС (рис. 5.1.1., 5.1.2.). Рівень експресії гена Ptgs2 в слизовій оболонці стравоходу групи ЛОС був відповідно в порівнянні

з контрольною групою відповідно в 6, 3,2 та 1,6 раза ( $p < 0,0001$ ) відповідно до контрольної групи.

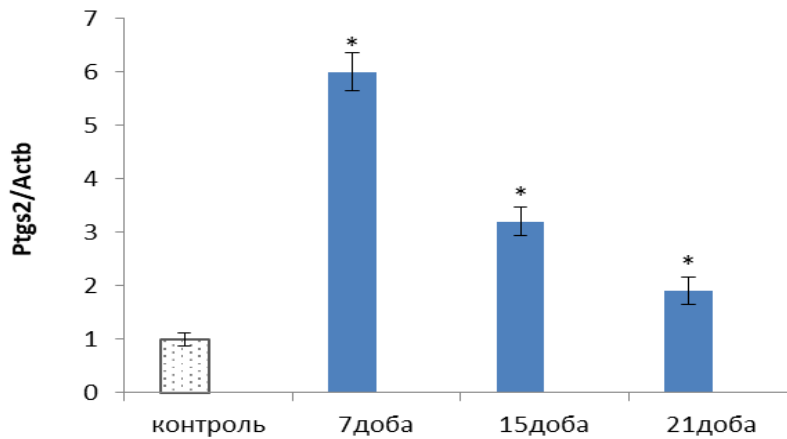


Рис. 5.1.1. Відносний рівень експресії мРНК гена Ptgs2 у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу (M±m, n=8, \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

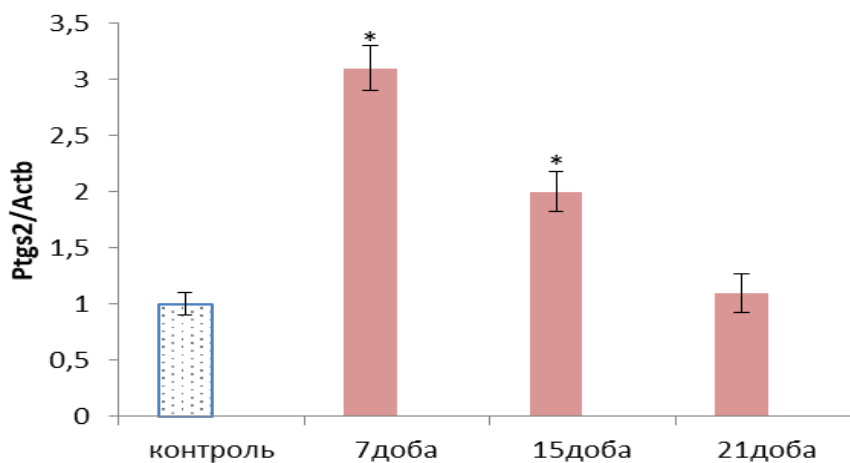


Рис. 5.1.2. Відносний рівень експресії мРНК гена Ptgs2 у крові за лужного опіку стравоходу (M±m, n=8, \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Нами був визначений рівень експресії гена Ptgs2 у крові. За лужного опіку ми спостерігали зростання рівню гена Ptgs2 у 3,1 і 2,0 раза на 7 і 15

добу, відповідно у порівнянні з контрольними значеннями. Станом на 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

Трансформаційний фактор росту бета (Tgfb) представник великої родини цитокінів, вони регулюють широкий діапазон клітинних процесів: проліферацію клітин, детермінацію, диференціацію, рух, адгезію і загибель. Завдяки складним часовим і тканинспецифічним характеристикам своєї експресії близькі до нього фактори росту відіграють ключову роль у розвитку, гомеостазі та репарації практично всіх тканин у різних організмах. Tgfb відповідає за значну частину внутрішньоклітинних сигналів, які вирішують долю клітини. Вплив цих факторів на клітини-мішені забезпечується поєднанням та активацією специфічних серин/треонінових протеїнкіназ — рецепторів I і II типів, які передають сигнал від поверхні клітини до ядра через низхідні ефекторні Бтагі білки [Massague J 1998, 170].

Tgfb має значну роль в процесі загоєння. За умов ушкодження Tgfb вивільняється у великій кількості. Є три підвиди Tgfb: Tgfb1, -b2, -b3. Перші два є активують синтезу колагену, здатні перешкоджати розпаду колагену. Tgfb3 може гальмувати утворення сполучної тканини. Вченими було встановлено, що у фібробластах, виділених з гіпертрофічних рубців, знижувалась експресія Tgfb2, у фібробластах келоїдних рубців знижена експресія Tgfb3 [171].

Нами було визначено рівень експресії генів Tgfb в сполучній оболонці стравоходу та сироватці крові за умов ЛОС (рис.5.1.3., 5.1.4.).

За ЛОС спостерігали зростання рівню експресії гена Tgfb1 у сполучній оболонці стравоходу в групі тварин. Станом на 7, 15 і 21 доби рівень був вищим у 6,9, 7 і 2,8 раза відповідно в порівнянні з контрольною групою.

У крові за ЛОС рівень експресії гена Tgfb1 був вищим у 3 та 2,9 раза на 7 і 15 добу відповідно в порівнянні з групою контролю. Станом на 21 добу рівень гена Tgfb1 повертався до контролю.

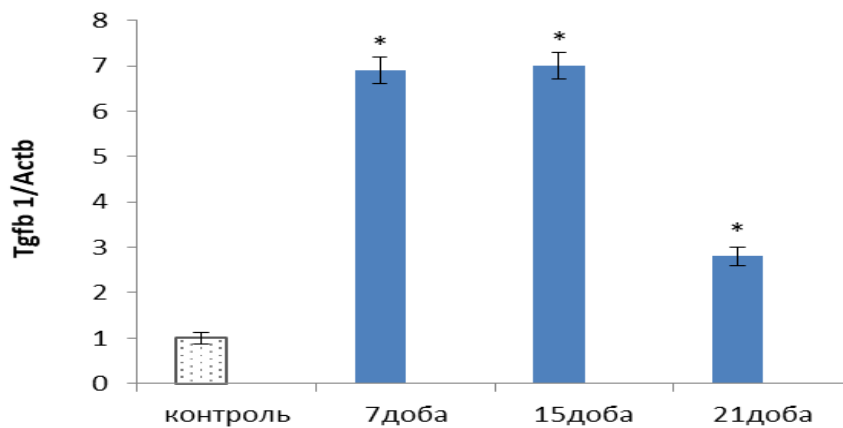


Рис. 5.1.3. Відносний рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Отже, за умов опіку стравоходу рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* зростав на 7 та 15 доби експерименту як у лейкоцитах крові, так і у слизовій оболонці стравоходу. Отримані зміни вказують на розвиток запалення за опіку стравоходу.

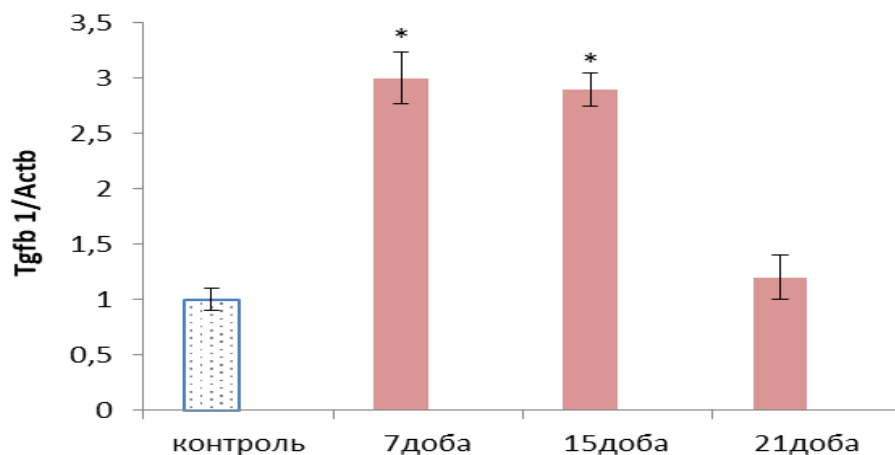


Рис. 5.1.4 Відносний рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* у крові за умов лужного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Ген Col2A1 відповідає за синтез мРНК для побудови одного з компонентів для колагену II типу - ланцюга про-альфа 1 (II). Щоб побудувати колаген типу II, три ланцюги про-альфа1 (II) взаємодіють разом, утворюючи триланцюгову молекулу проколагена. Колаген типу II відповідає за пружність та міцність сполучних тканин, які підтримують м'язи, суглоби, органи і шкіру. [101, 102]. Також є дані, щодо гену COL2A1, який є маркером прогнозу можливого постхірургічного спайкоутворення [103,104].

Було визначено рівень експресії генів Col2a1 в сполучній оболонці стравоходу та сироватці крові за умов ЛОС (рис.5.1.3., 5.1.4.).

Рівень експресії гена Col2a1 у сполучній оболонці стравоходу в групі тварин з ЛОС був нижчим у 5, 3 ( $p \leq 0,0001$ ) і 1,5 раза ( $p \leq 0,05$ ) на 7, 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем.

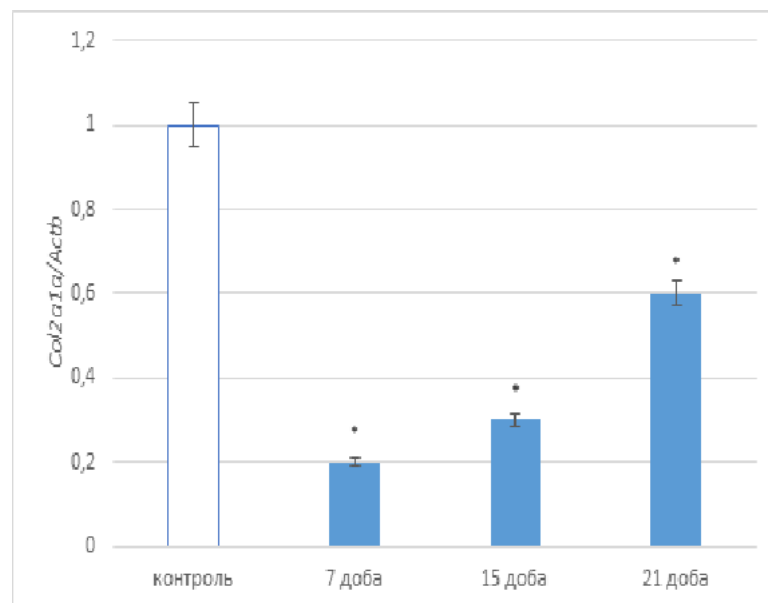


Рис. 5.1.5 Відносний рівень експресії гена Col2a1 (Col2a1/Actb) у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов лужного опіку стравоходу.

( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Рівень експресії гена Col2a1 у крові в групі тварин з ЛОС був нижчим у 3, 1,8 ( $p \leq 0,0001$ ) на 7, 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем.

На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

Рівень експресії мРНК гена *Col2a1*, який відповідає за синтез молекули колагену другого типу, у крові та сполучній оболонці стравоходу знижувався за умов ЛОС.

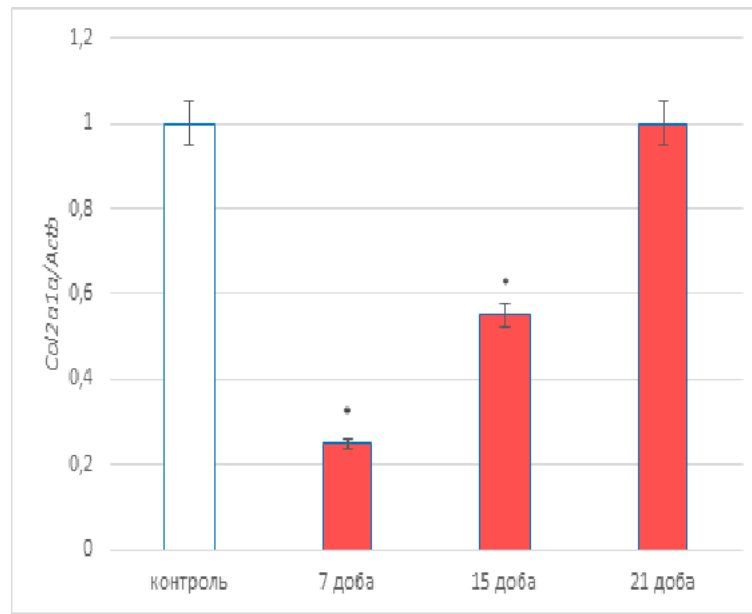


Рис. 5.1.6 Відносний рівень експресії гена *Col2a1* (*Col2a1/Actb*) у крові стравоходу щурів за умов лужного опіку стравоходу.

( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Таким чином, на початку експерименту ми спостерігаємо, що опік призводить до зниження рівня експресії мРНК гена *Col2a1*, але вже станом на 15 добу відбувається поступове підвищення рівня досліджуваного гену, як у крові так і сполучній тканині стравоходу, порівняно з 7 добою експерименту. Станом на 21 добу рівень *Col2a1* продовжує зростати і наближається до рівню контрольних значень. Оскільки *Col2a1* відповідає за пружність та міцність сполучної тканини, то припускаємо, що на 7 добу відбувається руйнування сполучної оболонки стравоходу і лише станом на 21 добу відбувається незначне відновлення клітин сполучної оболонки стравоходу за умов ХОС.

ФРФ - регулятори росту, диференціювання і функціональної активності клітин різних тканин (фактор росту фібробластів, фактор росту ендотеліоцитів, фактор росту епідермісу і трансформуючий фактор росту). Фактор росту фібробластів сприяють загоєнню ран і опіків. При багатьох спостереженнях було встановлено, що активації фактора росту фібробластів на ранніх етапах може у запобігати виникненню сепсису. Також встановлено, що ФРФ а також прискорює загоєння опікових ран [209, 210].

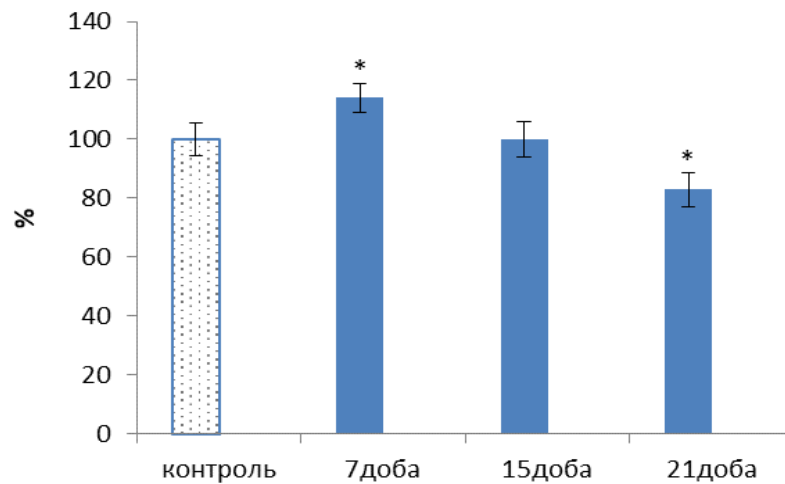


Рис. 5.1.7 Вміст фактору росту фібробластів у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу ,  
( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Ефектором фази регенерації тканин є фібробласти. На другу- третю добу після ушкодження, численними факторами зростання запускається міграція фібробластів до місця пошкодження і подальша їх проліферація. Паралельно проліферації фібробластів відбувається новоутворення судин - ангиогенез. Фібробласти є найбільш важливими клітинами, що беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, а також однією з основних клітин-мішеней фактору росту фібробластів при загоєнні ран [179]. Основний фактор росту фібробластів володіє вираженою здатністю

посилювати утворення сполучної тканини і судинних капілярів, а також приймає участь у регенерації тканин [180].

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

Нами було визначено вміст ФРФ за КОС (рис.5.1.7). Показано зростання вмісту ФРФ протягом експерименту. За КОС відбулося поступове зростання показника з максимальним підвищенням на 21 добу у 1,8 раза порівняно з контролем. Виключенням є 15 доба, в указаний період вміст ФРФ знижувався до контрольного, що корелює з рівнем ММП та ТІМП в даний термін.

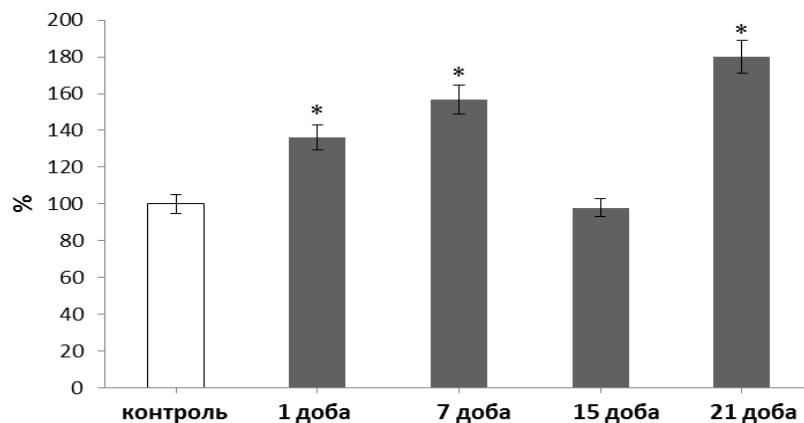


Рис. 5.1.8. Відносний вміст ФРФ слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ , \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем)

Згідно літературних даних, ФРФ синтезується в шкірі навколо судин. Ендотеліоцити та фібробласти приймають участь у синтезі фактору росту за uszkodження тканин [179]. Також, ангиогенез, опосередкований ФРФ, відбувається шляхом активації c-Jun N-кінцевої кінази/стрес-активованої протеїнкінази. Інгібування ФРФ призводить до зниження міграції

фіброblastів і затримки загоєння ран, в той час як застосування рекомбінантного ФРФ прискорює загоєння ран [181].

При дослідженні гістологічних зразків в групах за ЛОС (рис. 5.1.9.Б) був виявлене запалення, а також та наявність інфільтрації лейкоцитами. Також спостерігали патологічним процесом, а саме, приростання оболонки стравоходу до тканин трахеї станом на 7 добу експерименту

На 15 добу за ЛОС (рис. 5.1.9.В) зафіксували зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації. Також за ЛОС на 21 добу (рис. 5.1.9.Г) відбувалось хаотичне укладання волокон, та збільшення волокон колагену в підслизовій основі досліджуваного зразка. Отримані нами зміни на станом на 21 добу можуть бути передумовою патологічного загоєння. Такі зміни можуть вказувати на розвиток фіброзу.

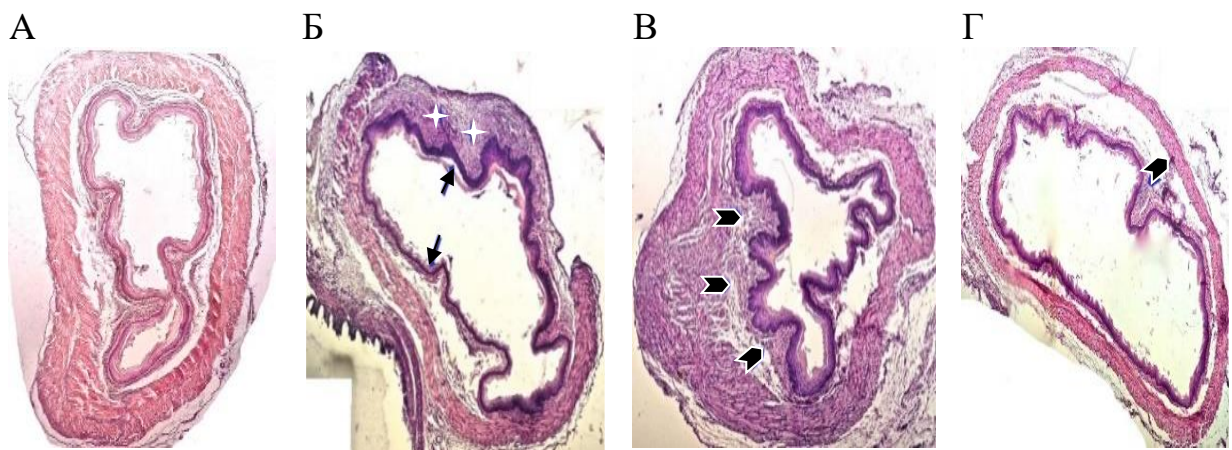


Рис. 5.1.9. Мікрофотографії тканин стравоходу контрольних щурів, щурів за лужного опіку стравоходу.

Забарвлення гематоксилін-еозином, ок.Х 10, об. Х 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 ХОС 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 ХОС присутня залишкова інфільтрація лейкоцитами та надмірне утворення сполучної тканини.

Нами був визначений рівень експресії мРНК генів *Ptgs2* та *Tgfb1* у сироватці та слизовій, було показано зростання досліджуваних показників протягом всіх термінів порівняно з контр. Нами був визначений відносний вміст фактору росту фібробластів, показано зниження на 21 добу. При гістологічному дослідженні нами було показано, що на 1 та 7 доби відбувається пошкодження сполучної оболонки стравоходу, а також надмірна інфільтрація лейкоцитами, на 15 та 21 ми спостерігаємо залишкову інфільтрацію лейкоцитами, а також наростання сполучної тканини та неправильне укладання м'язових волокон.

Таким чином аналізуючи регенеративні процеси за умов ХОС, 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 ХОС присутня залишкова інфільтрація лейкоцитами, надмірне утворення сполучної тканини а також хаотичне укладення м'язових волокон.

При опіку з'являється велика кількість нейтрофілів, виділяючи активні форми кисню підвищують концентрацію продуктів ПОЛ, що впливає на зниження активності ферментів АО системи. В свою чергу підвищується активність iNOS за рахунок трансскрепційного фактору NF- $\kappa$ B.

При запальному процесі активується iNOS і виділяє надмірну кількість NO, які в свою чергу активує експресію прозапальних генів та синтез прозапальних цитокінів, а саме (ІЛ-1). Прозапальні цитокіни активують синтез ММП в тканинах, висока (активність-вміст) яких інгібує вміст ТІМП1. Порушення балансу між синтезом ММП та ТІМП1 призводить до підвищення вмісту ФНП-а. Фактор некрозу в свою чергу впливає на синтез

цитокинового профіля. Високій вміст цитокінів підсилює активність iNOS і повторно сприяє розвитку оксидативного стресу.

Запальний процес. При опіку виділяється велика кількість медіаторів запалення, які активують Запальний процес, що в свою чергу, сприяє підвищенню вмісту прозапальних цитокінів, а саме (ІЛ 1). Які активують синтез ММП 1,3,2,9 (в тканинах). Висока (активність-вміст) яких інгібує (вміст-активність) ТІМП1. Порушення балансу між синтезом ММП та ТІМП1 призводить до підвищення вмісту ФНП-а. Збільшення ФНП-а в свою чергу впливає на синтез цитокинового профіля, що в свою чергу сприяє повторному розвитку запального процесу.

Нами було встановлено підвищення вмісту ММП-2 та ММП-9 в сполучній оболонці стравоходу, оскільки при пошкодженні тканин ММП потрапляють у кров, то нами було досліджено і виявлено підвищення вмісту ММП-2, та ММП-9 в кровотоці. Висока активність ММП спричиняє активацію неактивного плазміногену, та перехід його в активний плазмін. Внаслідок чого відбувається надмірне зростання активності плазміну та його аутокатализ. І як результат утворення нетипових форм білків. Таких як: продукти деградації білків (деградовані форми плазміну та утворення нейтрофільної еластази (23 кД) ), змінює білковий профіль (зростання гама глобулінової фракції, альфа глобулінової фракції, зниження альбумінової фракції).

Утворює високу концентрацію МСМ, що характеризують наявність надмірного протеолітичного процесу та утворення низькомолекулярних форм білків (молекулярною масою до 5000 дальтон). Та появою ММП-7, що може бути прогностичним маркером до злякисного переродження тканин стравоходу.

Висока концентрація нетипових форм білків призводить до підвищення вмісту аутоімунних антитіл (Ig класу G). Ми припускаємо, що поява аутоантитіл та надмірні протеолітичні процеси, що призводять до утворення

НФБ впливають на зміну біохімічних (неконтрольованих) процесів. (що може бути метою наших подальших досліджень). Таким чином порушення процесів протеолізу (та його циклічний характер), а також підвищена концентрація нетипових білкових форм негативно впливає на процеси регенерації.

Отже, як було встановлено, при ХОС відбувається порушення та надмірна активація протеолітичних процесів і логічно було б припустити, що інгібувавши протеоліз, ми б могли покращити регенерацію. Проведені раніше дослідження вказують, що за умов використання інгібіторів протеолізу, відбувається патологічний процес загоєння. (рубцювання). Тому ми припустили, що доцільно було вимкнути не сам протеоліз, який є наслідком. А первинні ланки ураження, якими є оксидативний стрес та запальний процес. Отже, перед нами постала задача пошуку певного інструменту – речовини, яка б володіла антиоксидантними властивостями, або протизапальними. Нашу увагу привернула речовина меланін, яка володіє не тільки антиоксидантними властивостями, але протизапальними та цитопротекторними властивостями.

Тому наступним етапом наших досліджень було з'ясування ролі процесів протеолізу в молекулярно-біохімічних механізмах, що супроводжують процеси загоєння ХОС за умов введення меланіну.

## РОЗДІЛ 6

### ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ (ЗАГОЄННЯ) ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

#### 6.1 Біохімічні параметри крові та слизової оболонки стравоходу за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну

Важкість прояву патологічних реакцій з боку різних органів, а також кінцевий результат захворювання залежать від ступеню тяжкості опіку, віку пацієнта, своєчасності надання допомоги та правильності обраної тактики терапії [110]. До опікової рани надходить значна кількість нейтрофілів, що починають продукувати активні форми кисню; це призводить до пошкодження мембрани клітин, особливо на тлі спаду активності ферментів антиоксидантного захисту, та сповільнює власне процес загоєння. Меланін володіє вираженою антиоксидантною активністю та здатністю нейтралізувати активний кисень, що може сприяти більш швидкому загоєнню опікової рани, яке супроводжуватиметься менш вираженими ускладненнями.

Як нами було показано, що хімічний опік стравоходу супроводжується порушенням процесів обміну та негативно впливає на функціонування інших систем органів [116]. Першочерговим діагностичним критерієм при визначенні ступеню тяжкості опіку є біохімічні показники сироватки крові.

Нами було визначено показники білкового обміну у крові експериментальних щурів в моделі ЛОС та досліджено їх зміни на тлі введення тваринам з ЛОС меланіну в дозі 1 мг/кг (табл. 6.1.1).

За умов ЛОС було показано зменшення концентрації загального білка на 7 та 15 добу, і лише на 21 добу показник дещо перевищував контроль.

Водночас введення меланіну спричиняло збільшення рівня загальної фракції білка на 7 добу на 54%, порівняно з показниками за ЛОС, практично наближаючи досліджуваний показник до контрольного рівня.

Таблиця 6.1.1

**Показники білкового обміну у крові 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
Загальний білок (г/л)	ЛОС	65,0±0,8	41,2±1,0*	60,5±0,7*	67,3±0,8*
	ЛОС + меланін		63,5±0,9#	61,4±1,5*	62,7±0,4*#
Альбумін (г/л)	ЛОС	37,5±2,5	23,6±1,1*	29,0±0,7*	31,1±0,8*
	ЛОС + меланін		29,5±1,2*#	35,2±1,3#	32,2±0,7*

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

За умов ЛОС було показано зменшення концентрації загального білка на 7 та 15 добу, і лише на 21 добу показник дещо перевищував контроль. Водночас введення меланіну спричиняло збільшення рівня загальної фракції білка на 7 добу на 54%, порівняно з показниками за ЛОС, практично наближаючи досліджуваний показник до контрольного рівня.

Вміст альбуміну за ЛОС був нижчим за контроль в усі терміни дослідження: на 7, 15 та 21 добу – на 37%, 23% та 17% відповідно. Введення меланіну призводило до збільшення концентрації альбуміну на 7 та 15 добу відповідно на 25% та 21%, порівняно з показниками за ЛОС.

Оскільки концентрація альбуміну у крові тварин визначається переважно інтенсивністю його синтезу в печінці [119], вищеописана гіпоальбумінемія може розглядатись як доказ порушення функціонування даного органу. В даному аспекті спостережуване збільшення рівня загального білка та альбуміну практично до контрольних показників за умов

введення меланіну може вважатись свідченням його відновлювального впливу на гепатоцити.

Тому логічним було дослідити показники активності печінкових ферментів у сироватці крові тварин з ХОС та за умов введення меланіну (табл. 6.1.2).

Таблиця 6.1.2

**Показники активності печінкових ферментів у сироватці крові за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
АсАТ (Од/л)	ЛОС	55,5±1,1	70,1±2,3*	63,1±2,0*	56,3±1,2
	ЛОС + меланін		62,3±1,4*#	48,4±2,0*#	39,7±2,1*
АлАТ (Од/л)	ЛОС	27,7±0,9	71,1±2,2*	64,1±2,3*	43±2,0*
	ЛОС + меланін		55,7±1,0*#	50,8±1,1*	47,7±1,5*#
ЛФ (Од/л)	ЛОС	354,2±3,5	513,2±4,7*	436,2±4,0	385,7±4,2*
	ЛОС + меланін		378,1±3,0*#	364,7±3,1*#	368,1±3,7*#

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

Активність АсАТ, АлАТ та ЛФ в моделі ЛОС зростала протягом усього експерименту, особливо на 7 та 15 добу. На тлі введення меланіну було показано зниження активності АсАТ в усі терміни дослідження: на 7, 15 та 21 добу – на 11%, 23% та 29% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС. Застосування меланіну також призводило до зменшення активності АлАТ, особливо на 7 та 15 добу – на 21% та 20% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС. Подібний вплив застосування меланіну показано і стосовно активності ЛФ: виявлено зниження досліджуваного показника,

особливо виражене на 7 та 15 добу – на 26% та 17% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС. Отримані дані можуть розглядатись як доказ відновлення функціонального стану клітин печінки на тлі введення меланіну.

Також було досліджено вплив меланіну на показники азотистого обміну у сироватці крові тварин за хімічного опіку стравоходу (табл. 6.1.3).

Таблиця 6.1.3

**Показники азотистого обміну у сироватці крові за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сечовина (мг/дл)	ЛОС	36,2±0,2	46,4±0,4*	44,9±0,5*	42,1±0,8*
	ЛОС + меланін		39,2±1,3*#	34,2±1,1*#	40,1±0,9*
Креатинін (мкмоль/л)	ЛОС	88,1±2,1	145,0±2,1*	120,0±2,9*	110,0±1,9*
	ЛОС + меланін		93,4±1,2*#	94,0±1,3*#	89,7±1,4#

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

Якщо за умов ЛОС концентрація сечовини та креатиніну істотно зростала протягом усього експерименту, то в групі тварин із введенням меланіну було виявлено зменшення досліджуваних показників практично до контрольного рівня. Наприклад, концентрація сечовини та креатиніну знижувалась на 7 добу на 15,2% та 36% відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС. Отримані дані можуть бути свідченням відновлення функціонування нирок.

Також було показано, що за умов ЛОС відбувається незначне збільшення концентрації холестерину в крові тварин, тоді як введення меланіну викликало його зменшення до рівня контрольних показників (табл.

6.1.4). Можливо, меланін сприяє мобілізації холестерину в печінці в складі жовчних кислот або виступає інгібітором синтезу ацетил-КоА-карбоксилази та синтезу жирних кислот.

Таблиця 6.1.4

**Показники концентрації глюкози та холестерину у сироватці крові за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Глюкоза (ммоль/л)	ЛОС	4,9±0,3	6,1±0,7*	6,2±0,6*	5,9±0,4*
	ЛОС + меланін		5,9±0,7*	5,7±0,5	5,2±0,6
Холестерин (ммоль/л)	ЛОС	4,2±0,1	4,4±0,1	4,2±0,3	4,6±0,2
	ЛОС + меланін		4,2±0,1	4,3±0,2	4,1±0,2 <sup>#</sup>

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем, <sup>#</sup> –  $p < 0,05$  порівняно з ЛОС

Підвищений рівень глюкози в крові тварин в моделі ЛОС також знижувався за умов застосування меланіну (табл. 6.1.4). Зокрема було показано його зменшення на 15 та 21 добу відповідно на 8% та 12%, порівняно з тваринами з ЛОС. Дане спостереження може бути результатом збільшення продукції інсуліну та інтенсивнішим використанням глюкози в периферичних тканинах.

Крім того було досліджено концентрацію хлоридів ( $Cl^-$ ) та фосфатів ( $P^+$ ), а також натрію ( $Na^+$ ), калію ( $K^+$ ), магнію ( $Mg^{+2}$ ) та кальцію ( $Ca^{+2}$ ) у сироватці крові за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (табл. 6.1.5 та 6.1.6)

Таблиця 6.1.5

**Концентрація хлоридів (Cl<sup>-</sup>) та фосфатів (P<sup>+</sup>) у сироватці крові 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
Cl <sup>-</sup> (ммоль/л)	ЛОС	110,0±1,1	98,4±1,5*	101,8±1,3*	103,6±1,4*
	ЛОС + меланін		104,8±1,5*#	105,2±1,0*#	107,2±1,3*#
P <sup>+</sup> (мг/дл)	ЛОС	3,98±0,3	9,3±0,4*	6,6±0,3*	5,5±0,4*
	ЛОС + меланін		6,1±0,6*#	6,1±0,6*#	5,3±0,5*

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

Було виявило зниження рівня калію на 7 добу на 23% на тлі застосування меланіну, порівняно з показниками за ЛОС. Концентрація Ca<sup>2+</sup> при введенні меланіну, навпаки, зростала на 43%, порівняно з тваринами в моделі ЛОС без використання коригуючого препарату.

Таблиця 6.1.6

**Концентрація натрію (Na<sup>+</sup>), калію (K<sup>+</sup>), магнію (Mg<sup>+2</sup>) та кальцію (Ca<sup>+2</sup>) у сироватці крові 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
Na <sup>+</sup> (ммоль/л)	ЛОС	156,2±1,1	148,0±1,3*	141,0±1,5*	150,0±1,1*
	ЛОС + меланін		149,4±1,1*	150,6±1,3*#	152,1±1,3*
K <sup>+</sup> (ммоль/л)	ЛОС	5,4±0,2	8,0±0,8*	6,9±0,3*	5,9±0,4
	ЛОС + меланін		6,1±0,5#	5,7±0,6#	5,5±0,7
Mg <sup>+2</sup> (ммоль/л)	ЛОС	0,91±0,01	0,7±0,1*	0,8±0,05*	0,8±0,1*
	ЛОС + меланін		0,8±0,05*	0,8±0,1*	0,9±0,1
Ca <sup>+2</sup> (мг/дл)	ЛОС	10,6±0,3	8,6±0,6*	8,1±0,5*	7,1±0,5
	ЛОС + меланін		10,9±0,4#	9,5±0,5*#	10,2±0,7#

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

Таким чином, нами були показані зміни основних біохімічних показників та водно-електролітного балансу у статевонезрілих щурів за умов лужного опіку стравоходу. А також встановлено коригуючий вплив на досліджувані показники застосування меланіну в дозі 1мг/кг, що може розглядатись як доказ його відновлюючого впливу на функціональну активність печінки та нирок [123].

Таблиця 6.1.7

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

Показник	Умови досліджу	Групи щурів			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ІЛ-16	ЛОС	0,088 $\pm$ 0,001	0,104 $\pm$ 0,007*	0,111 $\pm$ 0,009*	0,091 $\pm$ 0,0067
	ЛОС + меланін	0,088 $\pm$ 0,001	0,091 $\pm$ 0,004	0,094 $\pm$ 0,002#*	0,095 $\pm$ 0,003*
ІЛ-12	ЛОС	0,091 $\pm$ 0,001	0,112 $\pm$ 0,001*	0,081 $\pm$ 0,0025*	0,104 $\pm$ 0,007*
	ЛОС + меланін	0,091 $\pm$ 0,001	0,103 $\pm$ 0,002*	0,099 $\pm$ 0,003*	0,085 $\pm$ 0,002*
ІФН- $\gamma$	ЛОС	0,077 $\pm$ 0,004	0,091 $\pm$ 0,004*	0,088 $\pm$ 0,007	0,081 $\pm$ 0,002
	ЛОС + меланін	0,077 $\pm$ 0,004	0,087 $\pm$ 0,004*	0,081 $\pm$ 0,005	0,082 $\pm$ 0,004
ІЛ-6	ЛОС	0,063 $\pm$ 0,003	0,074 $\pm$ 0,003*	0,055 $\pm$ 0,001*	0,061 $\pm$ 0,003
	ЛОС + меланін	0,063 $\pm$ 0,003	0,067 $\pm$ 0,001*	0,063 $\pm$ 0,002	0,061 $\pm$ 0,001
ФНП- $\alpha$	ЛОС	0,067 $\pm$ 0,002	0,071 $\pm$ 0,002	0,063 $\pm$ 0,004	0,064 $\pm$ 0,001
	ЛОС + меланін	0,067 $\pm$ 0,002	0,066 $\pm$ 0,004	0,068 $\pm$ 0,005	0,071 $\pm$ 0,0025
ІЛ-4	ЛОС	0,089 $\pm$ 0,001	0,079 $\pm$ 0,001*	0,092 $\pm$ 0,001*	0,105 $\pm$ 0,005*
	ЛОС + меланін	0,089 $\pm$ 0,001	0,086 $\pm$ 0,004	0,076 $\pm$ 0,002*	0,087 $\pm$ 0,005
ІЛ-10	ЛОС	0,078 $\pm$ 0,006	0,073 $\pm$ 0,003	0,074 $\pm$ 0,002	0,084 $\pm$ 0,003
	ЛОС + меланін	0,078 $\pm$ 0,006	0,074 $\pm$ 0,001	0,072 $\pm$ 0,001	0,067 $\pm$ 0,004*

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

Таблиця 6.1.8

**Вміст протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) (ум.од./мл) у сироватці крові щурів за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ІЛ-4	ЛОС	0,089±0,001	0,079±0,001*	0,092±0,001*	0,105±0,005*
	ЛОС + меланін	0,089±0,001	0,086±0,004	0,076±0,002*	0,087±0,005
ІЛ-10	ЛОС	0,078±0,006	0,073±0,003	0,074±0,002	0,084±0,003
	ЛОС + меланін	0,078±0,006	0,074±0,001	0,072±0,001	0,067±0,004*

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

Як зазначалось раніше, нами було виявлено активацію імунної ланки за умов ХОС, що проявляється у змінах рівня прозапальних та протизапальних цитокінів. Тому доцільним було дослідити вплив меланіну на концентрацію прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-12, ІФН-γ, ІЛ-6, ФНП-α) та протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за ХОС (табл. 6.1.7, 6.1.8 та 6.1.9, 6.1.10).

Таблиця 6.1.9

**Вміст протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) (ум.од./мл) у слизовій оболонці стравоходу за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів			
		контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ІЛ-4	ЛОС	0,164±0,003	0,125±0,005*	0,134±0,01*	0,146±0,007*
	ЛОС + меланін		0,155±0,004*#	0,195±0,005*#	0,155±0,004*
ІЛ-10	ЛОС	0,171±0,004	0,11±0,005*	0,126±0,004*	0,139±0,008*
	ЛОС + меланін		0,166±0,004#	0,18±0,005*#	0,172±0,01#

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

Таблиця 6.1.10

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

Показник	Умови дослідю	Групи щурів			
		контроль	7 доба	15 доба	21 доба
ІЛ-1 $\beta$	ЛОС	0,102 $\pm$ 0,004	0,113 $\pm$ 0,007	0,118 $\pm$ 0,002*	0,106 $\pm$ 0,003
	ЛОС+меланін		0,106 $\pm$ 0,004	0,098 $\pm$ 0,006#	0,096 $\pm$ 0,007
ІЛ-12	ЛОС	0,161 $\pm$ 0,003	0,265 $\pm$ 0,011*	0,166 $\pm$ 0,003	0,172 $\pm$ 0,005*
	ЛОС+ меланін		0,156 $\pm$ 0,004#	0,145 $\pm$ 0,007*#	0,167 $\pm$ 0,002*
ІФН- $\gamma$	ЛОС	0,098 $\pm$ 0,002	0,101 $\pm$ 0,005	0,125 $\pm$ 0,008*	0,112 $\pm$ 0,008*
	ЛОС+ меланін		0,092 $\pm$ 0,008	0,102 $\pm$ 0,006#	0,089 $\pm$ 0,007#
ІЛ-6	ЛОС	0,091 $\pm$ 0,005	0,155 $\pm$ 0,011*	0,166 $\pm$ 0,01*	0,145 $\pm$ 0,009*
	ЛОС+ меланін		0,135 $\pm$ 0,011*	0,124 $\pm$ 0,008*#	0,115 $\pm$ 0,01*#
ФНП- $\alpha$	ЛОС	0,11 $\pm$ 0,004	0,175 $\pm$ 0,011*	0,165 $\pm$ 0,011*	0,145 $\pm$ 0,008*
	ЛОС+ меланін		0,145 $\pm$ 0,006*#	0,128 $\pm$ 0,005*#	0,125 $\pm$ 0,004*#

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

Нами не було виявлено достовірних змін рівня ІФН- $\gamma$  в сироватці крові у щурів з ЛОС на тлі введення меланіну, водночас у слизовій оболонці стравоходу встановлено зниження вмісту даного цитокіну на 20% у порівнянні з тваринами, що не отримували препарат.

Рівень ІЛ-1 $\beta$  в сироватці крові щурів на тлі введення меланіну в моделі ЛОС зменшувався, порівняно з тваринами, що не отримували препарат, проте залишався вищим за контроль – на 7 та 15 добу показник знижувався на 12% та 14% відповідно. В слизовій тканині стравоходу, навпаки, достовірних змін ІЛ-1 $\beta$  за введення меланіну показано не було.

За умов введення меланіну в моделі ЛОС було виявлено зменшення вмісту прозапального цитокіну ІЛ-6, та водночас збільшення рівня протизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 (найбільш виражене на 7 добу ЛОС – на 25% та 50% відповідно), порівняно з тваринами, що не отримували

препарат. Дане спостереження може слугувати доказом на користь зниження ризику септичних ускладнень за умов застосування меланіну [156].

Таким чином, ЛОС характеризувався вираженим і тривалим підвищенням у крові рівня маркерних прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, ІФ-гамма, ІЛ-6, ФНП- $\alpha$ ) і водночас зниженням вмісту протизапальних інтерлейкінів (ІЛ-4, ІЛ-10), що може свідчити про розвиток запалення та утворення гранульованої тканини, що в свою чергу призводить до формування рубців, збільшує ризик виникнення полі органної недостатності, сповільнює регенерацію і власне загоєння опікової рани. Застосування меланіну призводило до нормалізації показників цитокінового профілю, імовірно за рахунок скорочення фази переважання прозапальної цитокінової активності. Отримані дані дозволяють зробити припущення про зменшення формування гранульованої тканини та зниження ризику виникнення рубців, та загалом про прискорення загоєння опікової рани [156].

Відомо, що активація ПОЛ може призвести до оксидативного пошкодження мембран, пригнічення каталітичної активності ферментів та інших шкідливих ефектів, які порушують життєві функції клітин [125, 126]. За опіків відбувається зсув рівноваги між рівнем активних форм кисню та активністю систем антиоксидантного захисту [127]. Антиоксидантна активність фенольних сполук реалізується за допомогою різних механізмів: пригнічення утворення активних форм кисню, зв'язування вже утворених молекул синглетного кисню, а також іонів металів, що виступають каталізаторами реакцій утворення активних форм кисню, таким чином перериваючи каскад вільнорадикальних реакцій ПОЛ [128,129].

ПОЛ тісно пов'язане з обміном білків, ліпідів, нуклеїнових кислот тощо, а на тлі виснаження систем антиоксидантного захисту стає основним обтяжливим фактором у патогенезі низки захворювань.

За введення меланіну спостерігалася тенденція до зниження вмісту ТБК-активних продуктів як в сироватці, на 15 добу за ЛОС 1,5 раза, так і у

слизовій оболонці стравоходу – на 7 добу показник був нижчим в 3 рази, порівняно з показниками у тварин з ЛОС (табл. 6.1.11).

Таблиця 6.1.11

**Концентрація ТБК-активних продуктів (нмоль/мг білка) у слизовій оболонці стравоходу та в сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови дослідю	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	ЛОС	35,1±1,1	45,7±1,8*	54,1±2,3*	49,1±2,1*
	ЛОС+меланін		31,5±1,9#	36,6±1,5#	40,3±2,5*#
Слизова оболонка стравоходу					
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	ЛОС	203,6±4,0	619,3±5,9*	469,4±7,1*	255,5±6,5*
	ЛОС+меланін		243,2±6,1*#	273,8±5,5*#	203,7±4,5#

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

Концентрація ДК за умов введення меланіну знижувалась і в сироватці крові, і в слизовій оболонці стравоходу, порівняно з показниками у тварин з ЛОС, що не отримували препарат. Так, на 21 добу даний показник зменшувався в сироватці крові та слизовій стравоходу в 2,6 та 5,8 раза відповідно (табл. 6.1.12).

Таблиця 6.1.12

**Вміст дієнових кон'югатів (ДК) (мкМоль/мг) у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за хімічного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Показник	Умови дослідю	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	ЛОС	32,3±1,1	111,8±5,1*	157,3±5,6*	211,8±6,7*
	ЛОС+меланін		102,7±6,2*	89,1±4,5*#	80,1±2,5*#
Слизова оболонка стравоходу					
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	ЛОС	19,5±1,4	90,1±5,9*	113,1±7,3*	134,5±6,0*
	ЛОС+меланін		59,3±4,0*#	48,2±5,8*#	23,2±3,5#

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

Також було виявлено підвищення активності СОД на тлі введення меланіну у тварин з ЛОС, проте даний показник залишався нижче контролю. У сироватці крові активність СОД на 12% перевищувала показник за ЛОС. У слизовій оболонці стравоходу на 21 добу - на 13%, порівняно з показниками у тварин з ЛОС, що не отримували препарат (табл. 6.1.13).

Таблиця 6.1.13

**Активність супероксиддисмутази, ( ум.од/мг\*хв ) 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					
Супероксиддисмутаза, ум.од/ мг*хв	ЛОС	0,31±0,02	0,17±0,02*	0,16±0,02*	0,24±0,02*
	ЛОС+меланін		0,25±0,01*#	0,26±0,02#	0,28±0,02
Слизова оболонка стравоходу					
Супероксиддисмутаза, ум.од/мг*хв	ЛОС	4,81±0,31	5,21±0,31	3,21±0,11*	2,51±0,21*
	ЛОС+меланін		2,81±0,10*#	2,91±0,21*	3,21±0,21*#

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

При введенні меланіну було виявлено зниження активності каталази у слизовій оболонці стравоходу, найбільш виражене на 15 добу після ЛОС – в 1,6 раза, порівняно з даними за ЛОС без використання препарату (табл. 6.1.14).

Таблиця 6.1.14

**Активність каталази, ( ум.од/мг\*хв ) 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					
Каталаза, мкмоль/мг*хв	ЛОС	0,31±0,02	0,61±0,05*	0,81±0,03*	0,71±0,04*
	ЛОС+меланін		0,81±0,06*#	0,71±0,03*#	0,71±0,04*
Слизова оболонка стравоходу					
Каталаза, мкмоль/мг*хв	ЛОС	1,11±0,21	6,61±0,51*	5,21±0,41*	2,61±0,51*
	ЛОС+меланін		3,21±0,51*#	3,21±0,41*#	2,11±0,13*

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

За умов введення меланіну тваринам з ЛОС було виявлено зниження активності eNOS в сироватці крові, порівняно з показниками у тварин з ЛОС, що не отримували препарат. Також на тлі застосування меланіну було показано незначне зниження активності eNOS у слизовій тканині стравоходу на 7 та 15 добу після ЛОС, тоді як на 21 добу даний показник зростав на 18%, порівняно з показниками за ЛОС без введення препарату (табл.6.1.15).

Дослідження активності iNOS за умов введення меланіну показало зниження показників в сироватці крові на 7, 15 та 21 добу на 22%, 22% та 13% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС. У слизовій стравоходу також спостерігали зменшення активності iNOS протягом всього експерименту: на 7, 15 та 21 добу після опіку активність ферменту була нижчою на 28%, 29% та 27% відповідно, порівняно з показниками у тварин, що не отримували препарат (табл.6.1.16).

Таблиця 6.1.15

**Активність eNOS (ум.о/мг білка\*хв) та iNOS (ум.о/мг білка\*хв) 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					
eNOS, ум.од/мг*хв	ЛОС	0,57±0,01	0,67±0,02*	0,92±0,05*	0,62±0,05
	ЛОС+меланін		0,61±0,04	0,81±0,02*#	0,71±0,05*
Слизова оболонка стравоходу					
eNOS, ум.од/мг*хв	ЛОС	0,94±0,02	1,31±0,05*	1,44±0,08*	1,02±0,09
	ЛОС+меланін		1,24±0,04	1,36±0,07*	0,71±0,05*#

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

Дослідження активності iNOS за умов введення меланіну показало зниження показників в сироватці крові на 7, 15 та 21 добу на 22%, 22% та

13% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС. У слизовій стравоходу також спостерігали зменшення активності iNOS протягом всього експерименту: на 7, 15 та 21 добу після опіку активність ферменту була нижчою на 28%, 29% та 27% відповідно, порівняно з показниками у тварин, що не отримували препарат (табл.6.1.16).

Таблиця 6.1.16

**Активність eNOS (ум.о/мг білка\*хв) та iNOS (ум.о/мг білка\*хв) 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					
iNOS, ум.од/мг*хв	ЛОС	0,65±0,03	0,81±0,03*	0,95±0,06*	0,88±0,04*
	ЛОС+меланін		0,63±0,03#	0,74±0,03*#	0,76±0,04*#
Слизова оболонка стравоходу					
iNOS, ум.од/мг*хв	ЛОС	0,88±0,04	1,44±0,05*	1,56±0,09*	1,51±0,07*
	ЛОС+меланін		1,03±0,06*#	1,11±0,05*#	0,98±0,06#

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

Дослідження активності iNOS за умов введення меланіну показало зниження показників в сироватці крові на 7, 15 та 21 добу на 22%, 22% та 13% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС. У слизовій стравоходу також спостерігали зменшення активності iNOS протягом всього експерименту: на 7, 15 та 21 добу після опіку активність ферменту була нижчою на 28%, 29% та 27% відповідно, порівняно з показниками у тварин, що не отримували препарат (табл.6.1.16).

Таким чином, за умов хімічного опіку стравоходу на тлі інтенсифікації процесів ПОЛ (збільшення рівня ДК та ТБК-активних продуктів) відзначалося істотне пригнічення ферментів антиоксидантного захисту

(активність СОД). Тобто за умов опікової хвороби відбувається порушення рівноваги між активністю прооксидантних чинників та АОС за рахунок активації вільнорадикальних процесів. За умов введення меланіну в моделі ЛОС було виявлено тенденцію до відновлення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що дозволяє зробити припущення про скорочення термінів загоєння опікової рани. Було показано позитивний вплив меланіну на окремі ланки біохімічних, запальних процесів та окисно-антиоксидантну рівновагу за ХОС.

## **6.2 Вплив меланіну на перебіг процесів протеолізу в біохімічних механізмах загоєння опіку стравоходу**

Досліджено протеолітичний баланс у крові та слизовій оболонці стравоходу за ХОС (табл.6.2.1). За умов моделювання ЛОС показано підвищення вмісту ММП-1 та ММП-2 в сироватці крові. У дослідних групах, які отримували меланіну відбувалось зниження вмісту досліджуваних МП. На Вміст ММП-1 на 21 добу знижувався в 1,3 раза, ММП-2 в 1,4 раза порівняно з групою ЛОС.

У сполучній оболонці стравоходу за умов ЛОС вміст ММП-1 був найбільш високим У групах, де щури отримували меланіну відбувалось зниження вмісту ММП-1 на 7 добу в 1,2 раза; ММП-2 в 1,3 раза відповідно, порівняно з групою тварин тільки за опіку (табл.6.2.1).

У сироватці крові за моделювання ЛОС вміст ММП-3 підвищувався, за введення меланіну достовірних змін не виявлено. У сполучній оболонці стравоходу вміст підвищувався на 7 добу, в 1,6 раза. У сполучній оболонці стравоходу за меланіну вміст ММП-3 знижувався та наближався до контролю, Станом на 7 добу вміст ММП-3 знижувався в 1,6 раза порівняно з показниками за ЛОС.

Таблиця 6.2.1

**Вміст матричних металопротеїназ (ум.од/мг білка) у 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
Слизова оболонка стравоходу					
ММП 1	ЛОС	11,1±0,8	14,6±1,1*	13,1±0,9*	12,1±0,9
	ЛОС+меланін		12,3±1,2	12,1±0,7	10,1±0,8
ММП 2	ЛОС	13,1±0,9	19,1±1,4*	16,5±1,2*	19,6±1,5*
	ЛОС+меланін		15,1±1,1*#	14,4±1,2	14,1±0,9#
ММП 3	ЛОС	11,3±0,9	18,5±1,5*	12,6±0,9	12,2±0,9
	ЛОС+меланін		11,8±0,9#	10,5±0,8#	11,5±1,1
ММП 8	ЛОС	9,1±0,7	12,1±1,3*	9,8±0,9	9,2±1,1
	ЛОС+меланін		9,2±0,8#	9,7±0,7	9,1±0,9
ММП 9	ЛОС	12,2±0,8	18,6±1,5*	15±1,2*	19,6±1,6*
	ЛОС+меланін		14,5±0,9*#	13,4±1,1	15±1,3*#
Сироватка крові					
ММП 1	ЛОС	10,4±0,5	9,6±0,5	10,3±0,7	12,1±0,6*
	ЛОС+меланін		10,1±0,5	10,8±0,4	9,6±0,5#
ММП 2	ЛОС	10,5±0,8	9,3±0,9	10,1±0,7	13,7±0,8*
	ЛОС+меланін		9,8±0,4	10,1±0,4	9,7±0,5#
ММП 3	ЛОС	6,7±0,2	8,8±0,4*	5,5±0,2*	8,8±0,3*
	ЛОС+меланін		8,1±0,5*	7,2±0,3#	8,7±0,5*
ММП 8	ЛОС	5,5±0,2	7,7±0,4*	5,4±0,2	7,5±0,5*
	ЛОС+меланін		5,9±0,2#	5,7±0,3	6,8±0,4*
ММП 9	ЛОС	4,5±0,3	6,1±0,3*	6,9±0,4*	7,5±0,4*
	ЛОС+меланін		5,8±0,5*	6,6±0,2*	6,3±0,4*#

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

Вміст ММП-8 за у сироватці за умов ЛОС підвищувався, за меланіну спостерігали зниження вмісту ММП-8 на 7 в 1,3 , та 21 добу в 1,1 раза,

порівняно з опіком. Вміст ММП-8 у сполучній оболонці стравоходу зростав на 7 добу за ЛОС в 1,3 раза порівняно з контролем. За меланіну відбувалось зниження вмісту ММП-8 у слизовій оболонці стравоходу на 7 добу в 1,3 раза порівняно з показниками за ЛОС.

Вміст ММП-9 в сироватці крові зростав впродовж всього експерименту. вміст ММП-9 за меланіну знижувався на 21 добу за ЛОС в 1,2 раза порівняно з опіком стравоходу. вміст ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу був вище на 7 та 21 добу. За введення меланіну вміст ММП-9 знижувався, так на 7 в 1,3 та 21 добу та 1,3 раза порівняно з показниками за ЛОС.

Була визначена загальна протеолітична активність, активність серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові та слизовій оболонці щурів за ЛОС та за введення меланіну (табл. 6.2.2.). У плазмі крові загальна протеолітична активність підвищувалась впродовж всього експерименту. За опіку зростала на 7 добу на 294%, на 15 добу на 254%, та на 21 добу та 295% порівняно з контролем. За введення меланіну протеолітична активність знижувалась. А саме, на 7 добу на 56% порівняно з показниками в тварин з ЛОС.

За умов ЛОС загальна протеолітична активність у слизовій оболонці стравоходу зростала впродовж всього експерименту порівняно. Було показано, що активність зростала на 7 добу на 96%, на 15 добу станом на 137%, на 21 добу на 65%. В групах тварин, які отримували меланін відбувалась знижена активність протеолітичних ферментів. А саме: на 7 добу на 32%, на 15 добу на 33% та 21 добу на 31% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС (табл.6.2.2.).

При дослідженні серинових протеїназ, було встановлено, що їх активність в плазмі крові підвищувалась за умов опіку стравоходу на 7 добу у 4,7 раза, на 15 добу у 4,4 раза, та на 21 добу у 4,3 раза за ЛОС, порівняно з контрольними значеннями. При застосуванні меланіну спостерігалася нижча

активність серинових протеїназ в плазмі крові за ЛОС на 15 добу в 2,6 раза порівняно з показниками в тварин з опіком (табл.6.2.2).

Таблиця 6.2.2

**Загальна протеолітична активність, активність серинових протеїназ та металопротеїназ (ум.од/мг білка) у плазмі крові та слизовій оболонці щурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну**

( $M \pm m, n=8$ )

Показник	Умови досліджу	Групи щурів з ХОС			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
Загальна	ЛОС	1,25±0,09	3,71±0,21*	3,21±0,08 *	3,71±0,31*
	ЛОС +меланін		2,11±0,11 * #	1,81±0,09*#	2,41±0,41*#
Серинові	ЛОС	0,43±0,11	2,01±0,31*	1,91±0,21*	1,81±0,21*
	ЛОС + меланін		1,03±0,11*#	0,74±0,11*#	1,21±0,31*#
Металопротеїнази	ЛОС	0,61±0,11	1,41±0,09*	1,45±0,21*	1,71±0,11*
	ЛОС +меланін		0,88±0,09*#	0,89±0,08*#	1,08±0,21*#
Слизова оболонка стравоходу					
Загальна	ЛОС	1,94±0,09	3,81±0,11*	4,61±0,15*	3,21±0,21*
	ЛОС+меланін		2,61±0,21*#	3,11±0,41*#	2,21±0,11*#
Серинові	ЛОС	0,79±0,05	1,61±0,21*	1,71±0,25*	1,11±0,21*
	ЛОС+меланін		1,11±0,15*#	1,21±0,11*#	0,85±0,08
Металопротеїнази	ЛОС	0,9±0,07	1,41±0,12*	2,11±0,31*	1,51±0,21*
	ЛОС+меланін		0,98±0,11#	1,31±0,31*#	1,01±0,09#

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

Активність ММП в плазмі крові зростала на 7 добу в 2,3, добу, на 15 добу 2,3 та 21 добу та 2,7 раза. Таким чином, за ЛОС спостерігалось підвищення відповідно, порівняно з контрольними значеннями. В групах тварин, які утримували меланіну відбувалося зниження активності ММП в плазмі крові на 7 добу експерименту за ЛОС в 1,6 раза порівняно з показниками в тварин з ЛОС.

Активність металопротеїназ та серинових протеїназ у слизовій оболонці стравоходу зростала. Вона зростала впродовж всього експерименту порівняно з контрольними значеннями, так, для серинових протеїназ на 7, 15 та 21 добу на 102%, 115%, та на 39%,. Активність металопротеїназ зростала на 7, 15 та 21 добу на 56%, 133% та 67%. При застосуванні меланіну спостерігали зниження активності серинових протеїназ на 7 на 31%,, 15 на 29% та 21 добу на 22% відповідно. Схожий результат спостерігався для металопротеїназ активність яких при застосуванні мелану знижувалась на 7 добу на 30%, на 15 добу на 38% та на 21 добу на 33% порівняно з показниками за ЛОС.

Виявлена висока активність МП в тканинах, можуть вказувати на активний процес епітелізації. Активність МП зростала на 15 добу, цей період пов'язаний з активним ростом колагенових волокон. Показники активності ММП та серинових протеїназ на 21 добу за опіку стравоходу вказують на хронізацію запального процесу. Меланін сприяв зниженню активності протеїназ, завдяки зниженню їх експресії та впливу на транскрипційні фактори. Також причиною може бути зниження запального процесу, та ,як наслідок, зниженням активності протеолітичних процесів.

Нами було досліджено активність інгібіторів протеолізу  $\alpha 2$ -МГ та  $\alpha 1$ -АТ в плазмі крові за умов ЛОС та за введення меланіну (табл.6.2.3.).

Таблиця 6.2.3

**Активність  $\alpha 1$ -антитрипсину та  $\alpha 2$ -макроглобуліну у плазмі крові щурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Показник	Умови досліджу	Групи щурів			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
$\alpha 1$ антитрипсин (ІО/мл)	ЛОС	32,8 $\pm$ 3,8	36,9 $\pm$ 3,6	52,8 $\pm$ 4,3*	31,4 $\pm$ 2,4
	ЛОС+меланін		23,6 $\pm$ 2,2*#	28,2 $\pm$ 2,5#	27,3 $\pm$ 2,4
$\alpha 2$ макроглобулін (ІО/мл)	ЛОС	5,3 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 1,2	8,5 $\pm$ 1,2*	10,1 $\pm$ 1,4*
	ЛОС+меланін		4,8 $\pm$ 0,9	5,4 $\pm$ 0,94#	6,5 $\pm$ 1,01#

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

За ЛОС спостерігали зростання активності  $\alpha$ 1-АТ на 15 добу в 1,6 раза, порівняно з контролем. На 7 та 21 добу активність була на рівні контролю. За умов введення меланіну на тлі ЛОС рівень  $\alpha$ 1-антитрипсину знижувався на 15 добу в 1,9 раза порівняно з групою тварин з ЛОС.

Нами було визначено вміст тканинного інгібітора ММП (ТІМП-1) у сироватці крові та у слизовій оболонці стравоходу після моделювання ЛОС та за введення меланіну. Вміст ТІМП-1 в за ЛОС у сироватці крові знижувався. Виявлено, зниження на 15 та 21 добу за ЛОС порівняно з контролем. На 21 добу за введення меланіну вміст ТІМП-1 зростав порівняно з показниками при ЛОС в 1,2 раза. Вміст ТІМП-1 у слизовій оболонці стравоходу за опіку знижувався на 21 добу порівняно з контролем. На 21 добу за умов введення меланіну спостерігали зростання вмісту даного показника в 1,4 раза порівняно з показниками за ЛОС (табл. 6.2.4).

Таблиця 6.2.4

**Вміст ТІМП-1 (ум.од./мг білка) у крові та у слизовій оболонці  
стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну  
( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Показник	Умови дослідю	Групи щурів			
		Контроль	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові					
ТІМП 1 (ум.од./мг білка)	ЛОС	9,7 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,5*	8,4 $\pm$ 0,2*
	ЛОС+меланін		9,3 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,2*#	9,8 $\pm$ 0,3#
Слизова оболонка стравоходу					
ТІМП 1 (ум.од./мг білка)	ЛОС	17,4 $\pm$ 0,8	19,8 $\pm$ 1,2	15 $\pm$ 0,9*	12,4 $\pm$ 1,3*
	ЛОС+меланін		14,1 $\pm$ 1,3*#	13,3 $\pm$ 1,1*	17,1 $\pm$ 1,5#

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

Таким чином, доведено коригуючий вплив меланіну на баланс між протеїназами та їх інгібіторами плазми крові та слизовій стравоходу, що призводить до певної нормалізації метаболічних функцій та регенеративних процесів в організмі щурів, що зазнали ХОС.

### 6.3 Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов опіку стравоходу та за введення меланіну

Раніше нами було проведене дослідження, де ми виділення трипсиноподібних серинових протеїназ з плазми крові щурів за умов ЛОС, та за умов введення меланіну. Встановлено, що концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ в плазмі крові зростала за умов ЛОС на 7 добу на 71% та зменшувалась на 15 на 29% та 21 добу та 19% порівняно з контролем (табл.6.3.1).

Встановлено, що за введення меланіну щурам, за ЛОС концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ була нижчою на 7 добу на 34% порівняно з лужним опіком.

Таблиця 6.3.1

#### Концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ (мг/мл) у крові за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну

( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Умови досліджу	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 з контролем; #-  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС

Таким чином, ми спостерігали зростання концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ в плазмі крові. Такі зміни можуть бути пов'язані з розвитком оксидативного стресу в результаті опіку стравоходу. Такі зміни зумовлюють пошкодження клітинних мембран і вихід протеїназ в кровотік, а також можливим зниженням синтезу інгібіторів протеолізу [185]. Як відомо, меланін, як антиоксидант, здатен знижувати

активність перекисних процесів в організмі і, таким чином, може сприяти зниженню концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ.

Плазмін (ЕС 3.4.21.7) – це основний фермент фібринолітичної системи, він циркулює в кровотоці у формі неактивного проферменту – плазміногену. Плазмін є поліфункціональним білком, він приймає участь у регуляції численних фізіологічних та патофізіологічних процесів: ремоделюванні тканин, репродукції, ангіогенезі, запаленні, інвазії пухлинних клітин та багатьох інших [197].

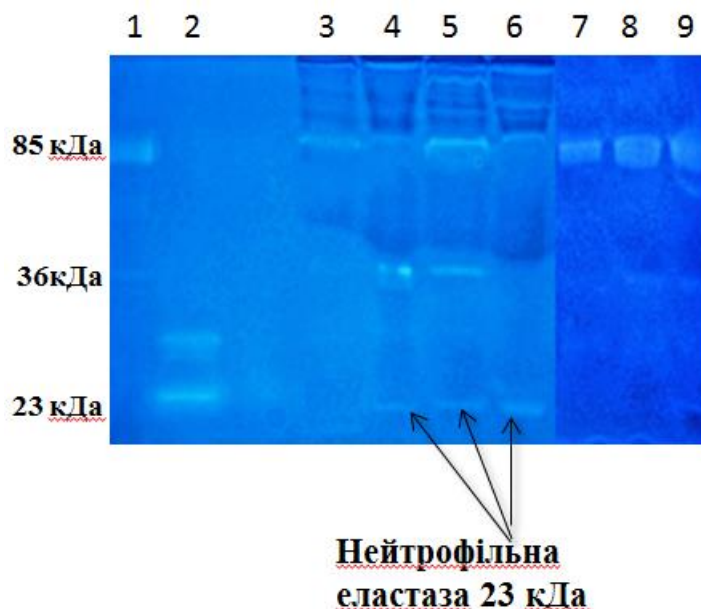


Рис. 6.3.1. Ензимограма трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну ( $M \pm m, n=8$ )

1,2-маркери; 3-контроль; 4- ЛОС 7 д.; 5- ЛОС 15 д.; 6 –ЛОС 21 д.;

7- ЛОС 7 д. +меланін; 8- ЛОС 15 д. +меланін; 9- ЛОС 21 д. +меланін

36 кДа – деградовані форми плазміну

23 кДа – нейтрофільна еластаза

Аналізуючи ензим-форезу трипсиноподібних серинових протеїназ нами було показано велику кількість низькомолекулярних активних протеолітичних ферментів, що утворились внаслідок деградації схильного до автолізу плазміну (рис. 6.3.1). Ми провели порівняльну роботу, а саме порівняли різні треки. При порівнянні треків за опіку з треками контрольних щурів, та треків щурів з опіком стравоходу, які отримували меланін, ми виявили, що низькомолекулярні похідні плазміну зустрічаються як за норми, так і за патології. однак ензим-фрези у плазмі щурів за ЛОС істотно відрізняються від норми як за кількісним, так і за якісним вмістом низькомолекулярних похідних плазміну. Таким чином, це може вказувати про посилення процесів, що можуть провокувати утворення деградованих форм плазміну/плазміногену в кровотоці.

Таблиця 6.3.2

**Якісний склад отриманих фракцій трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну (M±m, n=8)**

кДА	Групи щурів							
	Білкові фракції	контроль	7 доба		15 доба		21 доба	
			ЛОС	ЛОС+ меланін	ЛОС	ЛОС+ меланін	ЛОС	ЛОС+ меланін
127	-	-	+	-	+	-	-	
116	-	-	+	-	+	-	-	
106	+	-	+	-	+	-	+	
95	+	+	+	+	-	+	+	
90	+	+	-	+	-	+	-	
85 плазмін	+	+	+	+	+	+	+	
75д.ф. плазміна	-	+	-	-	+	+	-	
54д.ф. плазміна	-	-	+	-	+	-	-	
43д.ф. плазміна	+	+	+	-	-	-	-	
36міні-плазмін	-	+	-	+	+	-	+	
23 еластаза	-	+	-	+	-	+	-	

Нами були виявлені такі фракції « М.м. 127, 116, 106, 95 та 90 кДа можливо відповідають комплексам трипсиноподібних ферментів плазми крові з іншими білковими молекулами. Ми зробили припущення, що фракція з М.м. 85 кДа відповідає плазміну, відмічали підвищення його активності за ЛОС на 15 добу, що перевищувало контрольні значення на 40% порівняно з контрольними значеннями. Також нами була виявлена ще одна фракція з М.м. 36 кДа вона, ймовірно, відповідає міні-плазміну який утворюється в результаті автолізу плазміну, ця фракція з'являлась за лужного опіку, в контрольних пробах її не виявлено, це може вказувати про надмірну протеолітичну активність плазміну за умов опіку. Такі наслідки, 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 (табл.б.3.3).

Таблиця 6.3.3

**Відносний вміст білкових фракцій (мкг/мг білку), у сироватці крові шурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну, ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Білкові фракції	Групи шурів						
	Контроль	7 доба		15 доба		21 доба	
		ЛОС	ЛОС+ меланін	ЛОС	ЛОС+ меланін	ЛОС	ЛОС+ меланін
168	86,8 ± 2,5	143,0±00,9*	74,2±2,1*#	190,2±0,2*	69±1,5*#	183,8±5,2*	55,1±2,8*#
150	156,7±3,7	219,9±11,4*	39,2±2,3*#	275,0±10,2*	41,9±1,5*#	320,7±19,6*	56,1±2,1*#
130	449,2±28,9	326,4±9,2	47,1±2,8*#	231,6±8,12*	142,4±1,5*#	73,2±7,4*	26,1±0,8*#
113	60,8±2,8	9,5±0,8	43,3±2,05*#	62,4±2,8*	13,9±1,2*#	30,6±1,4*	14,5±2,8*#
103	185,2±11,7	21,8±2,6*	25,4±1,6*	33,7±1,7*	23,8±1,6*#	13,6±0,1*	30,1±1,4*#
89	126,0±9,1	6,2±0,2*	60,6±3,5*#	9,8±0,4,1*	3,9±0,4*#	5,02±0,1*	50,2±2,7*#
67	325,1±16,7	149,3±2,9*	349,7±7,2*#	173,0±16,9*	128,7±4,8*#	234,0±9,9*	311,8±6,9*#
55	221,0±9,7	57,4±1,8*	54,1±2,5*	136,1±6,8*	47,9±2,7*#	128,2±4,2*	63,4±2,2*#
~40	145,0±0,9	40,0±0,6*	54,8±2,5*#	139,0±3,2*	20,1±1,8*#	40,0±0,8*	50,1±1,3*#
~25	79,8±3,1	77,0±2,6*	50,1±2,1*#	48,1±0,8*	5,3±0,1*#	18,0±0,1*	53,7±0,8*#
~15	74,5±1,9	68,3±1,1 *	81,4±1,8*#	20,2±0,1 *	38,4±2,7*#	69,8±0,9*	45,5±1,8*#

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

Аналіз електрофореграми білкового складу сироватки крові в контрольних зразках та пробах отриманих від тварин з ЛОС та ЛОС за введення меланіну показав наявність фракцій від 15 до 168 кДа (табл. 6.3.3).

Було показано, що за умов ЛОС спостерігалось прогресуюче підвищення вмісту фракцій з М.м 168 та 150 кДа протягом всього експерименту. Нами було показано, за при введенні меланіну відзначалося зниження вмісту фракцій з М.м. 168 та 150 кДа як порівняно з ЛОС так, і порівняно з контрольними значеннями.

Виявлена нами фракція з М.м. 67кДа, що ймовірно відповідає альбуміну за ЛОС. Вміст якої знижувався протягом всього експерименту так, за введення меланіну спостерігали менш виражене зниження даної фракції порівняно з контрольними значеннями. Зростання вмісту даної фракції в 2,3 раза на 7 добу порівняно з показниками за ЛОС. Зниження вмісту альбумінів, можливо, є наслідком зростання проникності судинної стінки і трансудації їх з кров'яного русла, а також може свідчити про порушення функціонального стану печінки, оскільки саме вона є основним місцем синтезу альбумінів [175].

Зміни, які ми отримали при дослідженні вмісту фракцій з М.м 55, 40,25 та 15 кДа мали різнонаправлені зміни як за умов опіку так і при застосуванні меланіну. Вміст фракції з М.м. 40 кДа починав поступова знижувались на 7 та 21 добу за умов ЛОС в 3 рази порівняно з контролем. За умов ЛОС фракція з М.м. 25 кДа знижувалась на 15 добу в 1,7 раза та на 21 добу в 4,4 раза порівняно з контрольними значеннями.

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

Отже, рівень МСМ варіює залежно від метаболічного стану організму і, таким чином він слугує прогностичним критерієм порушення обмінних процесів [218].

При синдромі ендогенної інтоксикації у крові та тканинах стравоходу з'являються неспецифічні токсини у великих кількостях, Тому, важливо було дослідити вміст показників які виникнути внаслідок ЛОС та оцінити яким чином меланін впливає на показники ендогенної інтоксикації за умов ЛОС. До неспецифічних токсинів відносять МСМ, що утворюються при протеолітичному розщепленні білків плазми, простагландини, та ін. Рівень цих речовин відображає стан організму. Цей показник є скринінгом азотемії, показником ступеня інтоксикації, уремії, і в цілому характеризує функціональний стан нирок [220, 221]. Аналіз проведених досліджень показав, що ЛОС викликає підвищення рівня МСМ, за введення меланіну відбувалось зниження рівня МСМ.

Концентрація МСМ За умов ЛОС зростала в усіх досліджуваних зразках, встановлено, що за введення меланіну відбувалось зниження концентрації МСМ на 7 добу в сироватці крові на 52% та у слизовій оболонці стравоходу на 8% порівняно з показниками за ЛОС (табл.6.3.4).

Таблиця 6.3.4

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

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		0,48±0,01*#	0,41±0,02#	0,44±0,02
Слизова оболонка стравоходу					
МСМ (ум.од./мг білка)	ЛОС	0,15±0,01	0,19±0,01*	0,17±0,01	0,16±0,01
	ЛОС+меланін		0,17±0,01	0,16±0,01	0,11±0,01

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

Концентрація ОП за умов ЛОС зростала в усіх досліджуваних зразках особливо на 7 добу, порівняно з контролем. Було показано, що за введення меланіну відбувалося зниження концентрації ОП на 7 добу в сироватці крові на 52% та у слизовій оболонці стравоходу на 8% порівняно з показниками за ЛОС (табл.6.3.5).

Таким чином, виявлено що за умов опіку стравоходу рівень МСМ та ОП зростає у всіх досліджуваних зразках. Станом на 7 та 15 добу дослідження спостерігали підвищення даних показників. Такі зміни відповідають стадії токсемії та септикомії. Таким чином, підвищену концентрацію МСМ та ОП може пояснюватись надмірною активацією протеолітичних процесів.

Таблиця 6.3.5

**Вміст олігопептидів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного 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					
ОП (ум.од./мл)	ЛОС	0,17±0,01	0,31±0,03*	0,15±0,02*	0,17±0,03
	ЛОС+меланін		0,21±0,01*#	0,17±0,02	0,18±0,02
Слизова оболонка стравоходу					
ОП (ум.од./мг білка)	ЛОС	0,13±0,01	0,16±0,01*	0,15±0,01*	0,14±0,01
	ЛОС+меланін		0,16±0,01*	0,14±0,01	0,13±0,02

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

Нами показано підвищений рівень специфічних токсинів, а саме олігопептидів у сироватці крові та слизової оболонки стравоходу. В групах тварин, які вживали меланіну відбувалось зниженню даного показника.

Нами було проведено аналіз ензімограми слизової оболонки стравоходу, що виявив білкових фракцій з молекулярними масами 92 та 20 кДа за умов ЛОС та при застосуванні меланіну (рис. 6.3.2.).

Було показано, що за умов ЛОС спостерігається наявність фракції, що може відповідати ММП-9 протягом всього експерименту порівняно з контрольними значеннями, за введення меланіну активність ММП-9 знижувалась.

Активність ММП-7 була висока на 7 та 21 добу експерименту, за умов введення меланіну ми не спостерігали активність ММП-7 на 7 та 21 добу. [216].

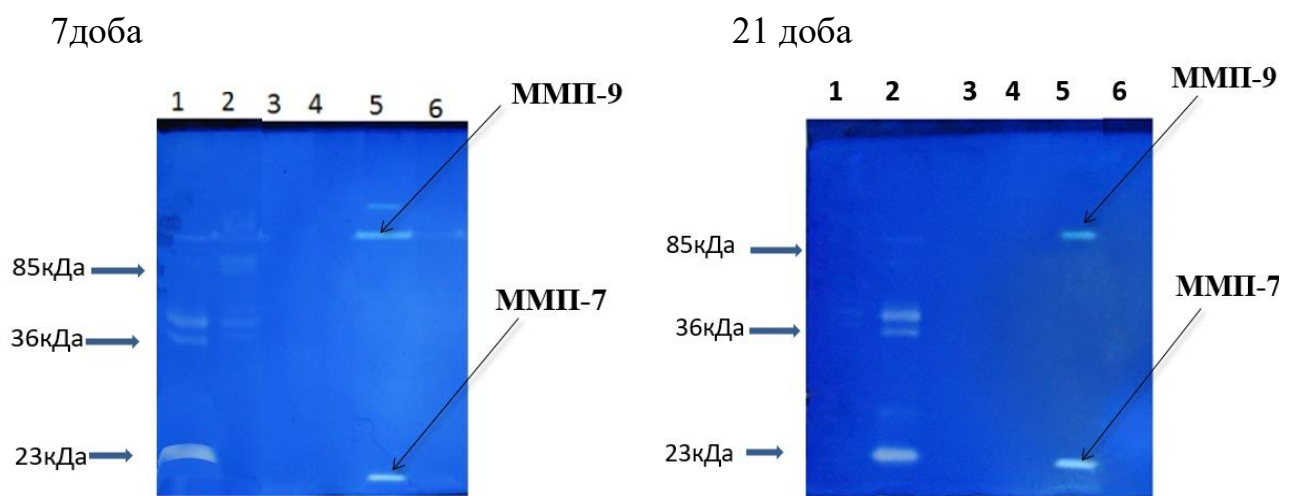


Рис. 6.3.2. Ензимограми матричних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну

1, 2-маркери;

3,4-контроль;

5- ЛОС 7/21доба;

6- ЛОС 7/21доба + меланін

В сироватці крові нами було визначено вміст імуноглобулінів класу G. IgG має велике значення в протиінфекційному захисті, він забезпечує пасивний імунітет в ранньому віці, також він продукуються у відповідь на проникнення в організм вірусів і бактерій [161, 162].

Тому, нами було визначено вміст IgG в сироватці крові. Було встановлено що, за умов ЛОС вміст IgG підвищувався порівняно з

контролем. Високі показники на 21 добу можуть свідчити про хронічний запальний процес, який характерний для опіку стравоходу. За меланіну спостерігали зниження вмісту IgG в сироватці крові на 7 та 21 добу порівняно з показниками у тварин з ЛОС так, на 7 добу на 23,5%, на 21 добу на 44,1% (табл.6.3.6.).

Таблиця 6.3.6.

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

Умови досліджу	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

ЛОС характеризувався тривалим підвищенням IgG, що може вказувати на розвиток запального процесу, було встановлено, що при використанні меланіну скорочується період цитокінової активності у крові щурів, пришвидшується нормалізація деяких показників, що приводить до прискорення процесів загоєння опікової рани.

Таким чином, представлені дані показують, що за умов ХОС ми спостерігали порушення протеїназно-інгібіторного балансу в плазмі крові. Показано зростання протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Нами було показано зростання низькомолекулярних форм плазміну, дані зміни можуть вказувати про надмірну його активацію. Виявлено, що меланін впливав на зниження активності протеїназ та відповідно їх інгібіторів. Отже, аналіз 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 умов ЛОС та меланіну ми спостерігаємо відсутність раніше утворених 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 глобулі нової фракції, та зростання альбумінової. При визначенні вмісту МСМ у сироватці та слизовій за ЛОС та меланіну, було показано зниження вмісту МСМ порівняно з опіком. При аналізі ензімограми у слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС та за меланіну, нами була не виявлена (раніше присутня) фракція яка (може) відповідати ммп-7 що може бути прогностичним маркером злякисного переродження тканин стравоходу. Нами був визначений вміст IgG в сироватці, було показано, зниження IgG порівняно з ЛОС.

Показано, що при застосуванні меланіну за умов опіку стравоходу не спостерігається утворення нетипових білкових фракцій, що може свідчити про нормалізацію протеолітичних процесів та первинних ланок ураження.

#### **6.4 Процеси загоєння за умов хімічного опіку стравоходу за введення меланіну**

Було визначено рівень експресії генів *Ptgs2* у слизовій оболонці стравоходу та сироватці крові за умов ЛОС та при застосуванні меланіну. (рис.6.4.1., 6.4.2).

У слизовій оболонці стравоходу рівень експресії гена *Ptgs2* у в групі тварин з ЛОС був вищим у 6 раз на 7 добу, у 3,2 раз на 15 добу і 1,6 раз на 21 добу, відповідно до контролю.

У групах тварин, за меланіну, досліджуваний показник був нижчим на 7 добу у 1,3 раз, на 15 добу у 1,7, ніж у тварин другої групи. Станом на 21

добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень), та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 4,5, та 1,9 раза на 7 і 15 добу загоєння відповідно.

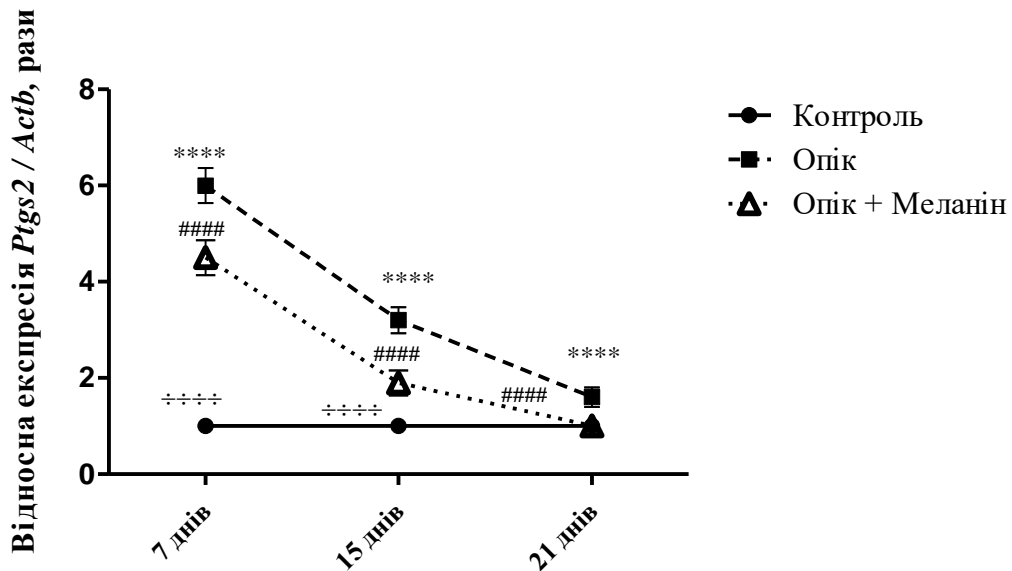


Рис. 6.4.1. Відносний рівень експресії гену *Ptg2* у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу та введення меланіну; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ); 1 – контроль; 2 – опік; 3 – опік + меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  опік відносно контролю; ##### -  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ -  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном порівняно з контролем.

При дослідженні рівень експресії гену *Ptg2* у крові, були виявлені такі зміни: у групі тварин з ЛОС, рівень був вищим у 3,1 і 2,0 раза на 7 і 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем. На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

У групі тварин щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,4 раза нижчим на 7 добу, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 2,3 раза ( $p \leq 0,0001$ ). І вже на 15 добу рівень експресії гену *Ptg2* був на рівні контролю.

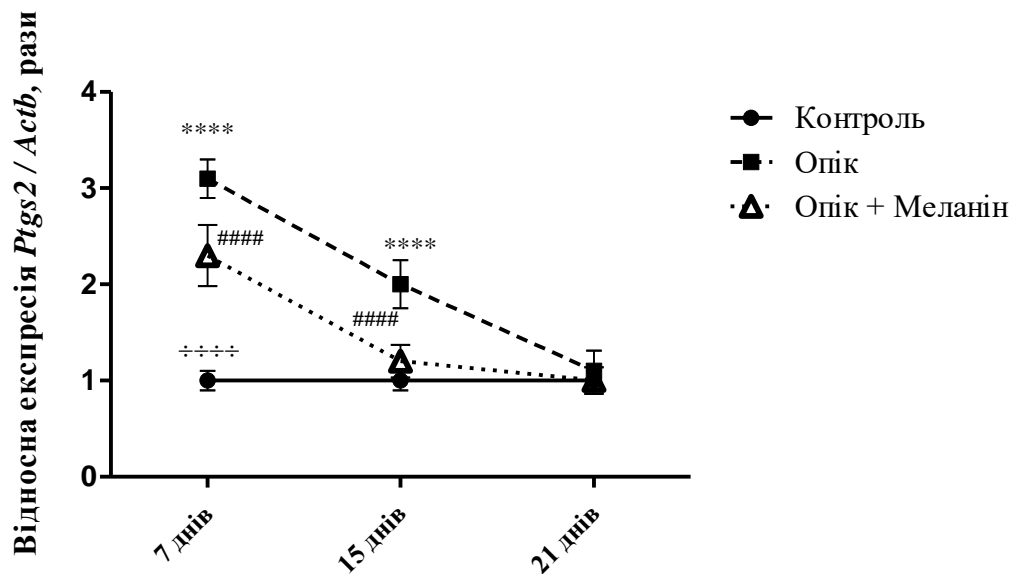


Рис. 6.4.2. Відносний рівень експресії гену *Ptgs2* у крові щурів за лужного опіку стравоходу та введення меланіну; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ), 1 – контроль; 2 – опік; 3 – опік + меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  опік відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ –  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном порівняно з контролем.

Нами було досліджено, рівень експресії гена *Tgfb1* у слизовій оболонці стравоходу. Встановлено, рівень за ЛОС був вищим у 6,9, 7 і 2,8 раза на 7, 15 і 21 добу відповідно в порівнянні з контролем (рис.6.4.3, 6.4.4).

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

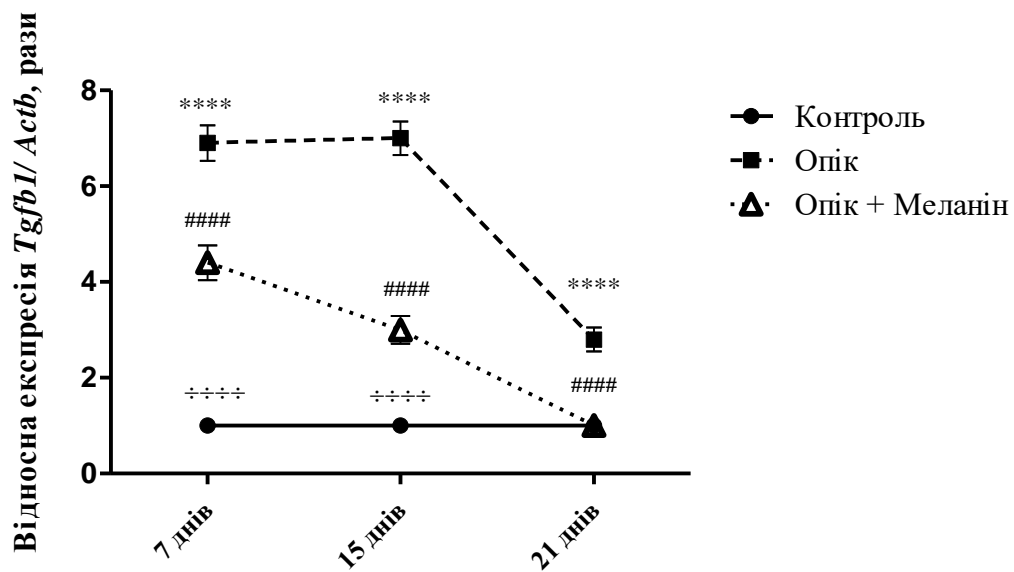


Рис. 6.4.3. Відносний рівень експресії гена *Tgfb1* у слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу та введення меланіну; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ), 1 – контроль; 2 – опік; 3 – опік + меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  опік відносно контролю; ##### -  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ -  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном порівняно з контролем.

Нами було визначено рівень експресії гена *Tgfb1*. Даний показник на 7 був вищим у 3 рази, та 15 добу у та 2,9 раза у крові в групі тварин з ЛОС порівнянні з контролем. Даний показник на 21 добу повертався до контрольних значень. У щурів, за введення меланіну, цей показник на 7 добу був нижче в 1,4 раза. На 15 добу нижчим у 2,1 раза ніж у тварин з ЛОС

Було встановлено, що за умов хімічного опіку стравоходу рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* підвищувався. Такі зміни прослідковувались на 7 та 15 добу експерименту як у крові, так і в слизовій, що може вказувати на розвиток запального процесу.

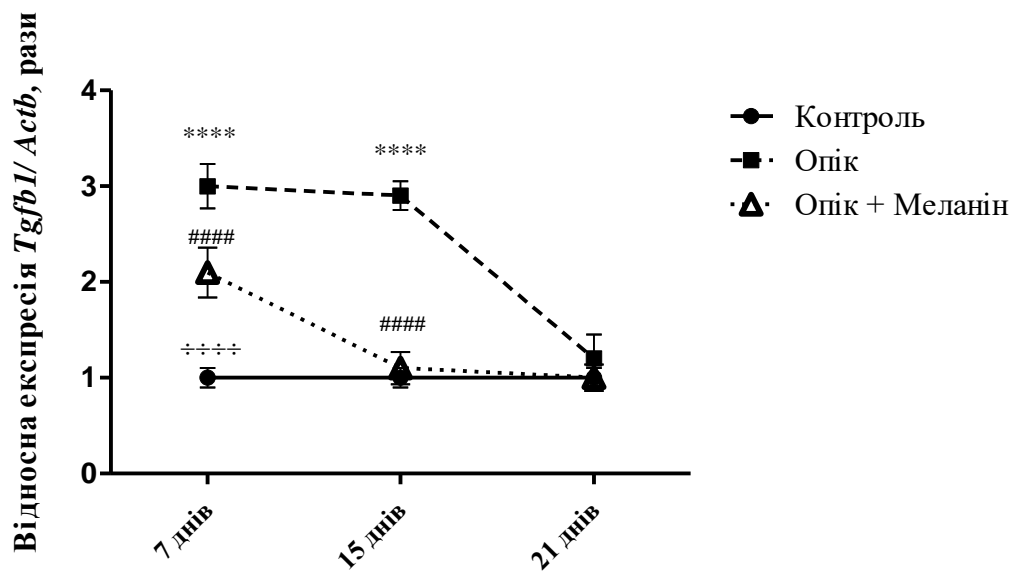


Рис. 6.4.4. Відносний рівень експресії гена *Tgfb1* у крові щурів за лужного опіку стравоходу та введення меланіну; ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ), 1 – контроль; 2 – опік; 3 – опік + меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  опік відносно контролю; ##### -  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ -  $p \leq 0,0001$  опік при лікуванні меланіном порівняно з контролем.

У групах щурів, яким вводили меланін відбувалось зниження рівня експресії досліджуваних генів. Такі зміни можуть вказувати на те, що меланін може знижувати запальний процес, а отже і пришвидшувати загоєння ранової поверхні після опіку.

Ген *Col2A1* відповідає за синтез мРНК для побудови одного з компонентів для колагену II типу - ланцюга про-альфа 1 (II). Щоб побудувати колаген типу II, три ланцюги про-альфа1 (II) взаємодіють разом, утворюючи триланцюгову молекулу проколагена. Колаген типу II відповідає за пружність та міцність сполучних тканин, які підтримують м'язи, суглоби, органи і шкіру. [31, 32].

Рівень експресії гена *Col2a1* у слизовій оболонці стравоходу в групі тварин з ЛОС був нижчим у 5, 3 ( $p \leq 0,0001$ ) і 1,5 раза ( $p \leq 0,05$ ) на 7, 15 добу

загоєння відповідно в порівнянні з контролем (Рис. 6.4.5).

Нами було показано, що на 15 добу у групах щурів, які вживали меланін, цей показник був в 2,1 раза ( $p \leq 0,01$ ) вищим відповідно, ніж у тварин групи ЛОС. Станом на 21 добу рівень мРНК не відрізнявся від контролю, але був дещо зниженим відносно контролю: на 7 добу у 4 раза ( $p \leq 0,0001$ ) і на 15 добу 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) відповідно.

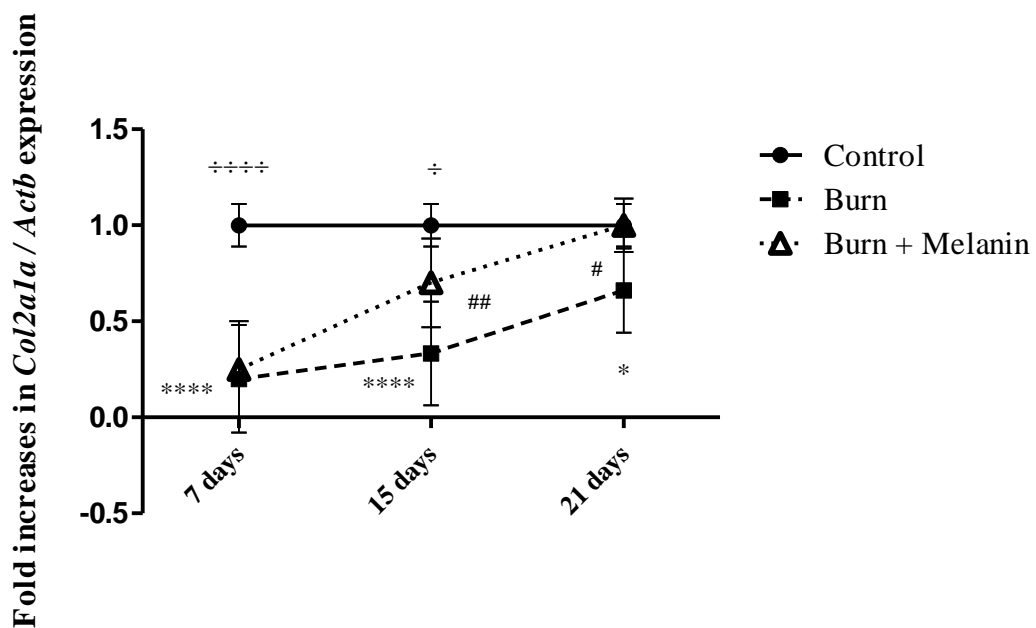


Рис. 6.4.5. Рівень експресії мРНК гена *Col2a1* у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну, ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ), 1 – контроль; 2 – ЛОС; 3 – ЛОС + меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ , \* –  $p \leq 0,05$  ЛОС відносно контролю; ## –  $p \leq 0,01$ , # –  $p \leq 0,05$  ЛОС + меланін відносно ЛОС; ÷÷÷÷ –  $p \leq 0,0001$ , ÷ –  $p \leq 0,05$  ЛОС + меланін порівняно з контролем.

Рівень експресії гена *Col2a1* у крові в групі тварин з ЛОС був нижчим у 3, 1,8 ( $p \leq 0,0001$ ) на 7, 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (Рис. 6.4.6). На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,8 раза ( $p \leq 0,05$ )

вищим на 7 добу, ніж у тварин другої групи та виявився менш зниженим відносно контролю: у 1,7 раза ( $p \leq 0,0001$ ). На 15 добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень.

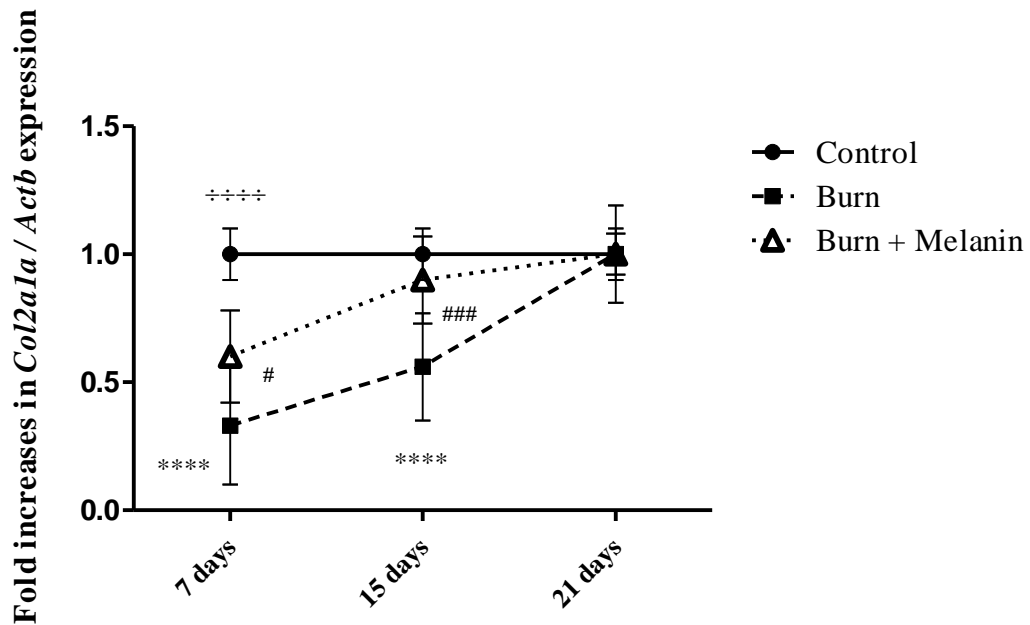


Рис. 6.4.6. Рівень експресії мРНК гена *Col2a1* у крові за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну.

( $M \pm m$ ,  $n=8$ ), 1 – контроль; 2 – ЛОС; 3 – ЛОС + меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$ , \* –  $p \leq 0,05$  ЛОС відносно контролю; ## –  $p \leq 0,01$ , # –  $p \leq 0,05$  ЛОС + меланін відносно ЛОС; ÷÷÷÷ –  $p \leq 0,0001$ , ÷ –  $p \leq 0,05$  ЛОС + меланін порівняно з контролем.

Таким чином, на початку експерименту ми спостерігаємо, що опік призводить до зниження рівня експресії мРНК гена *Col2a1*, але вже станом на 15 добу відбувається поступове підвищення рівня досліджуваного гену, як у крові так і слизовій оболонці стравоходу, порівняно з 7 добою експерименту. Станом на 21 добу рівень *Col2a1* продовжує зростати і наближається до рівню контрольних значень.

Оскільки *Col2a1* відповідає за пружність та міцність в сполучній тканині, то припускаємо, що на 7 добу відбувається руйнування тканин

стравоходу і лише станом на 21 добу відбувається незначне відновлення клітин сполучної тканини за умов хімічного опіку. За умов введення меланіну рівень експресії гена *Col2a1* зростає в порівнянні з групою ЛОС2, що може вказувати на більш швидку регенерацію клітин сполучної тканини.

При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу в групах з ЛОС за введення меланіну (рис. 6.4.7А) було помітне зниження інфільтрації лейкоцитами, всіх 3-х оболонок стравоходу, як наслідок - нижчий рівень запалення порівняно з показниками у тварин з ЛОС (рис.5.1.9.Б).

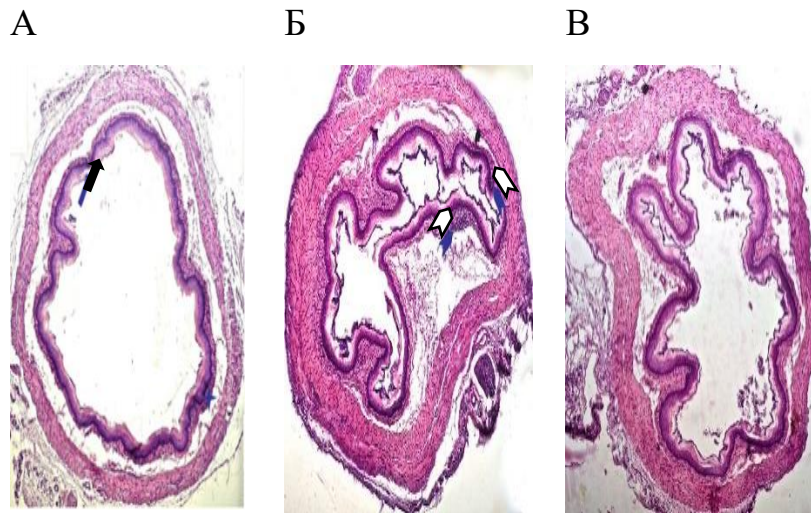


Рис.6.4.7. Мікрофотографії тканин стравоходу контрольних щурів, щурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну.

Забарвлення гематоксилін-еозином, ок. X 10, об. X 10. А – ЛОС 7 доба + меланін; Б – ЛОС 15 доба + меланін; В – ЛОС1 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. 6.4.7.Б) присутність лейкоцитів повністю знівельована, порівняно з ЛОС (рис. 5.1.9.В). На 21 добу досліджень за ЛОС за умов застосування меланіну (рис. 6.4.7.В ) 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.

При гістохімічному виявленні колагенових волокон за методом Ван Гізона вони забарвлюються в червоних колір. Значна їх кількість розташовується в другій оболонці стравоходу підслизовій основі, що утворена сполучною тканиною, разом із власними залозами стравоходу, які забарвлюються в жовтий колір (Рис.6.4.8.А). Після моделювання ЛОС на 7 добу відбувається набряк підслизової основи (Рис. 6.4.8.Б), та інфільтрація лейкоцитами. Крім цього, спостерігається руйнування та розшаровування слизової оболонки стравоходу, описані зміни стравоходу відповідають другому ступеню опіку [26]. При застосуванні меланіну за умов ЛОС набряк підслизової основи та лейкоцитарна інфільтрація менш виражена (Рис. 6.4.8. В).

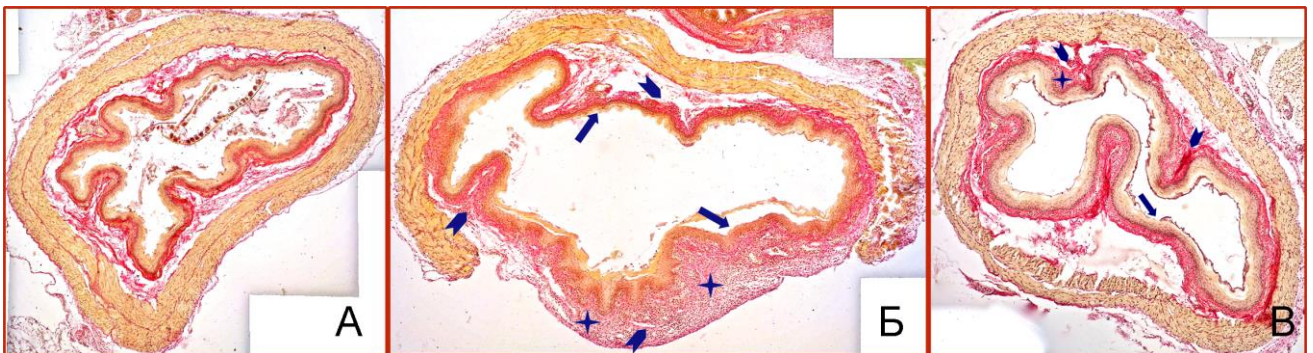


Рис. 6.4.8. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 7 добу експерименту: контрольна (А), група ЛОС (Б), ЛОС + меланін (В). Гістохімічне забарвлення за Ван Гізонам на виявлення колагенових волокон (червоні), ок.10 х об.10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини.

На 15 добу експерименту група з ЛОС продовжується лейкоцитарна інфільтрація (Рис. 6.4.9.). набряк зменшується, проте ділянки запалення

починають заміщуватись на власне сполучну тканину з високим вмістом колагенових волокон, розташування яких поширюється як в підслизовій, так і в м'язовій оболонці. За умов дії меланіну лейкоцитарна інфільтрація знижується. Така дія меланіну може бути пов'язана зі швидким зниженням надмірного запалення, яке може стимулювати фібробласти до надмірного синтезу колагенових волокон та, як наслідок, до фіброзу та утворення рубця [27].

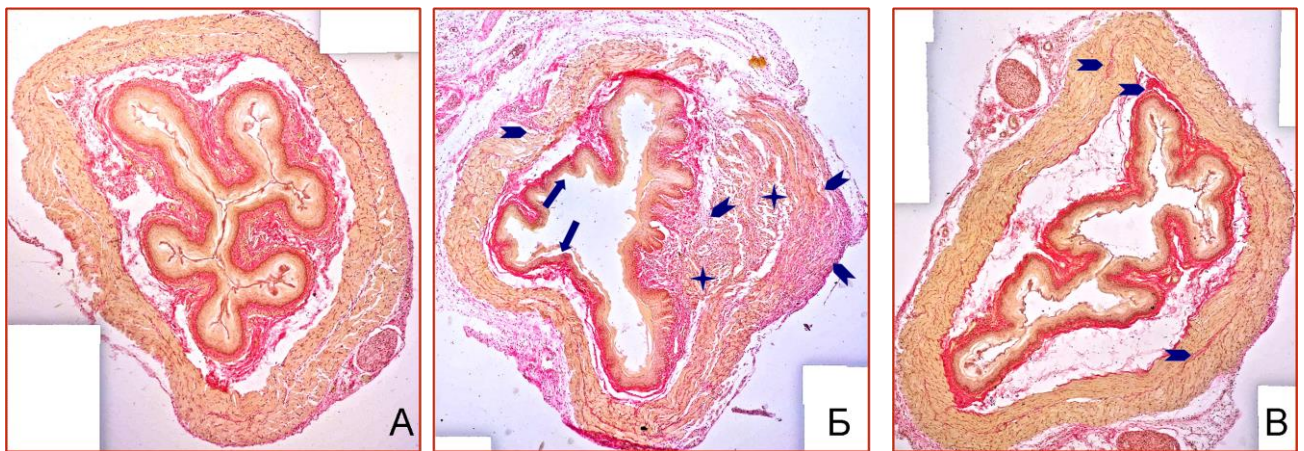


Рис. 6.4.9. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 15 добу експерименту: контрольна (А), група ЛОС (Б), ЛОС + меланін (В). Гістохімічне забарвлення за Ван Гізоном на виявлення колагенових волокон (червоні), ок.10 х об.10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини.

На 21 добу у щурів з ЛОС спостерігається розростання колагенових волокон в усій товщі підслизової оболонки та частково в м'язовій, не тільки поміж циркулярним та поздовжнім шарами, але і між окремими міоцитами (Рис. 6.4.10.). При використанні меланіну в м'язовій оболонці майже не фіксується депонування колагенових, а в підслизовій оболонці надмірне відкладання відбувається не по всій її частині, а лише в ділянках ушкодження стравоходу.

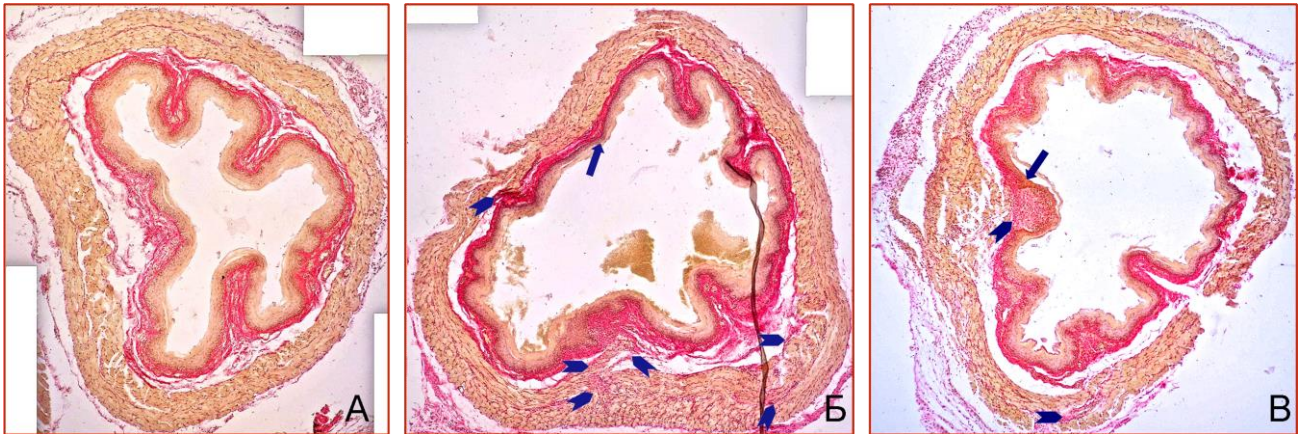


Рис. 6.4.10. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 21 добу експерименту: контрольна (А), група ЛОС (Б), ЛОС + меланін (В). Гістохімічне забарвлення за Ван Гізоном на виявлення колагенових волокон (червоні), ок.10 х об.10, панорамне зображення. Позначення: стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини.

За даними гістохімічного аналізу (Рис. 6.4.11.) відносного вмісту колагенових волокон на 7 добу після моделювання ЛОС підвищується на 30% площа, яку займають колагенові волокна, в порівнянні з контрольною групою.

На 15 добу у групі ЛОС відносний вміст колагенових волокон зростає на 91%, що пов'язано з гіперактивацією фібробластів внаслідок надмірного запалення та лейкоцитарної інфільтрації [28]. За дії меланіну площа, яку займають колагенові волокна, зменшується на 21% в порівнянні з групою ЛОС. На 21 добу отримали схожі результати: група ЛОС мала підвищений відносний вміст колагенових волокон на 78% порівняно з контролем та їх зниження за умови застосування меланіну на 23% від групи ЛОС.

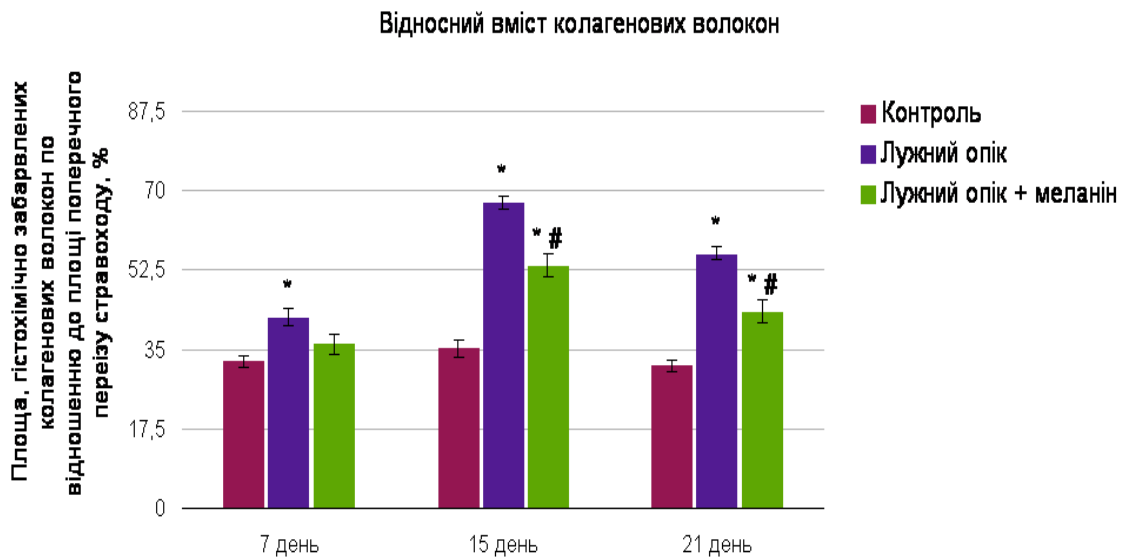


Рис. 6.4.11. Дані морфометричного аналізу відносного вмісту колагенових волокон на 7, 15 та 21 добу експерименту. \* –  $p \leq 0,05$  експериментальні групи в порівнянні з контрольною групою; # –  $p \leq 0,05$  ЛОС + меланін в порівнянні з групою ЛОС.

Крім відносного вмісту колагенових волокон, про загальний стан стравоходу після лужного опіку та процес утворення сполучнотканинного рубця свідчить індекс стеноза, оскільки порушення в регуляції синтезу і накопичення колагенових волокон провокує утворення сполучнотканинних рубців, що веде до звуження просвіту стравоходу [29, 30].

На 7 добу індекс стеноза зростає як в групі ЛОС (на 37%), так і при застосуванні меланіну на 30% в порівнянні з контролем, що обумовлено розвитком запального процесу та набряком.

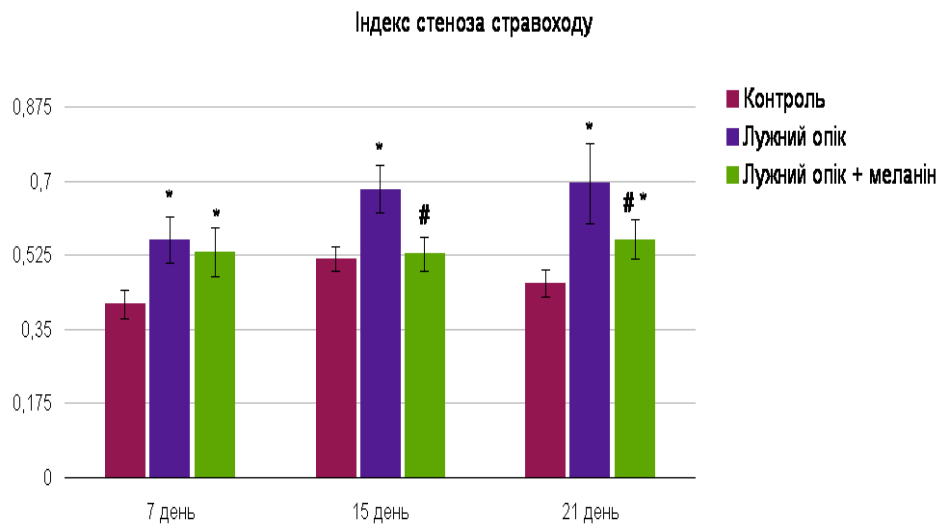


Рис. 6.4.12. Дані морфометричного аналізу індексу стеноза стравоходу та відносного вмісту колагенових волокон на 7, 15 та 21 добу експерименту. \* –  $p \leq 0,05$  експериментальні групи в порівнянні з контрольною групою; # –  $p \leq 0,05$  ЛОС + меланін в порівнянні з групою ЛОС.

Проте, на 15 добу на тлі збільшеного індексу стеноза у ЛОС (на 31%), за введення меланіну розміри просвіту стравоходу повертаються до рівня контролю. На 21 добу індекс стеноза набуває проміжного значення при застосуванні меланіну на тлі ЛОС - менший за ЛОС на 20% за групу ЛОС, та більший на 23% від контролю, в той час як індекс стеноза у групі ЛОС становить на 52% більше за контроль.

Показано зниження рівня експресії гену, залученого до синтезу колагену *Col2a1* у крові та слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС. Визначено інтенсивність депонування колагенових волокон, а також виміряно індекс стенозу стравоходу. За введення меланіну підвищувався рівень експресії гену *Col2a1* у крові та слизовій оболонці стравоходу порівняно з показниками за ЛОС. Оцінено вплив меланіну на дані процеси, а саме: менш виражене утворення колагенових волокон в ушкоджених тканинах стравоходу, що вказує на протизапальні та антифібротні

властивості цієї речовин та показує перспективність використання меланіну як речовини, що сприяє загоєнню ХОС без утворення патологічного рубця.

Було визначено рівень ФРФ у слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС та при застосуванні меланіну (табл.6.4.1). 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

Таблиця 6.4.1

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

Умови дослідю	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, при застосуванні меланіну відзначалося зниження рівня експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb 1*. За введення меланіну підвищувався рівень експресії гену *Col2a1* у крові та сполучній оболонці стравоходу порівняно з показниками за ЛОС. Встановлено підвищення вмісту фактору росту фібробластів. Проведені гістологічні та дослідження показали, що за умов застосування меланіну відбувається відновлення уражених тканин стравоходу вже на 21 добу. При гістохімічному та морфометричному аналізі було оцінено вплив меланіну на дані процеси, показано менш виражене утворення колагенових волокон в ушкоджених тканинах стравоходу, що вказує на протизапальні та антифіброзні властивості цієї речовин.

Отже, представлені дані показують, що за умов ХОС відбувається порушення балансу між протеїназами та їх інгібіторами. Нами було

встановлено, зростання протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Виявлено було низькомолекулярних форми плазміну. Такі зміни можуть вказувати 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.

Нами був визначений рівень експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* у сироватці та слизовій оболонці стравоходу, було показано зниження досліджуваних показників протягом всіх термінів за умов ЛОС та введенні меланіну. Визначений відносний вміст фактору росту фібробластів за ЛОС за введення меланіну, показано зростання вмісту на 21 добу порівняно з ЛОС. При гістологічному та гістохімічному дослідженні нами було показано, що у зразках які були отримані від тварин з ЛОС, які вживали меланін не відбувалося патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу та відбувалося загоєння.

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

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, тяжкістю опікової травми, складністю і тривалістю лікування таких хворих, частою інвалідизацією та високою летальністю. За видом агента, що викликає ХОС найчастіше розрізняють: лужні та кислотні. Тяжкість ХОС залежить від кількості та концентрації вжитої хімічної речовини [1-3].

Опіки супроводжуються запальною реакцією, розвивається синдром ендогенної інтоксикації порушується функція антиоксидантних систем. В подальшому, спостерігається порушення репаративних механізмів в тканинах стравоходу з переходом їх в хронічну форму, внаслідок цього, утворюється надлишкова грануляційна тканина, з формуванням надлишкового фіброзу, що набуває форми рубцевої контрактури, втрати повноцінних функцій органу, аденокарциноми стравоходу. Процеси протеолізу мають безпосереднє відношення до реакцій запалення та деструкції тканин і є необхідною умовою нормального перебігу регенерації [1, 4-20].

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, що є однією з патогенетичних ланок у розвитку деструктивних та запальних процесів. 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 [1, 19-22].

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 [23,24].

Не менш актуальною на сьогодні вважається проблема пошуку нових речовин з комплексними властивостями які сприятимуть швидшому загоєнню опікової рани. На сьогодні, одним з перспективних методів є використання природних антиоксидантних речовин як цитопротектори . Рослини, які збагачені поліфенольними сполуками, потенційно можуть впливати на більш швидше відновлення ушкоджених тканин опікових ран і мати антибактеріальний ефект . Однією з таких речовин для нормалізації процесу загоєння за ХОС є речовина меланін продуцентом якого є дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, які висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез [25-32].

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 регенеративних процесів за цих умов.

Метаболічні процеси за ХОС у щурів. Одними з перших показників які можуть показати функціональний стан організму та його метаболічні порушення за хімічних опіків є біохімічні показники сироватки крові [219, 220]. Було визначено основні біохімічні показники у сироватці крові за умов ЛОС та КОС. За обох типів ХОС відбувалося зниження концентрації

загального білка та альбуміну, зростання концентрації сечовини та креатиніну, підвищення активності амінотрансфераз (АСаТ, АЛаТ) та лужної фосфатази, спостерігалася зміна концентрації показників йонного 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 ХОС у щурів. За опіку стравоходу відбувається утворення активних форм кисню, активні форми кисню активують транскрипційні фактори AP-1 та NF- $\kappa$ B, які регулюють секрецію цитокінів, хемокінів та факторів росту. Відповідь організму на опікову травму це неспецифічна запальна реакція, внаслідок якої підвищується синтез цитокінів [221, 222]. Активність запальної реакції залежить від площі та глибини ураження, характеру інфекційного агента та активності імунної відповіді. 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- $\alpha$ ).

За обох типів ХОС підвищувався вміст прозапальних цитокінів переважно на 7 добу, що показує активацію запальної реакції за патологічного процесу. На 15 та 21 добу динаміка змін рівня цитокінів була різнонаправленою. 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, порівняно з контрольними значеннями. У слизовій оболонці стравоходу рівень ІЛ-1 $\beta$  підвищувався на 7 добу та знижувався на 15 та 21 добу, порівняно з контролем. Рівень ІЛ-1 $\beta$  за КОС був вище контрольного рівня протягом усього терміну дослідження. На 21 добу рівень ІЛ-1 $\beta$  наближався до контрольних значень. Таке тривале підвищення вмісту цитокіну ІЛ-1 $\beta$  свідчить про активацію запального процесу у щурів з хімічним опіком, що узгоджується з літературними даними [221-223].

ФНП- $\alpha$  стимулює проліферацію різних типів лімфоцитів, синтез антитіл, та адгезивних молекул, активує синтез білків гострої фази, може брати участь у реалізації специфічного та неспецифічного імунітету [223-225]. Рівень ФНП- $\alpha$  за ЛОС на всі досліджувані доби 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, порівняно з контролем. У слизовій оболонці стравоходу рівень ІФН- $\gamma$  мав незначне підвищення. 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 [226, 227]. 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.

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 ХОС у щурів. Велика кількість нейтрофілів, що надходить до опікової рани, починає продукувати значну кількість активних форм кисню, який на тлі зниження активності антиоксидантних ферментів (АОФ) сприяє пошкодженню мембран. Це може уповільнювати процес

загоєння. Істотне значення має й надмірна активація процесів ПОЛ. Оксидативний стрес формується при зростанні активності вільнорадикальних процесів на фоні зниженої активності систем антиоксидантного захисту, в результаті чого відбувається накопичення токсичних продуктів, обумовлюючи серйозні метаболічні порушення [223, 226, 227].

Оксидативний стрес є важливим механізмом у розвитку опікової травми, тому ми визначили інтенсивність ПОЛ за умов ХОС, рівень первинних продуктів ПОЛ - ДК та вторинних – ТБК-активних продуктів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу.

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. У слизовій оболонці стравоходу концентрація ДК підвищувалася за ЛОС протягом усього експерименту, максимальні значення спостерігалися на 21 добу. 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. Тоді як у слизовій стравоходу найвище значення показника спостерігали на 1 добу після опіку, на 21 добу після опіку спостерігається часткове зниження вмісту дієвих 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.

За умов ЛОС концентрація ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів упродовж усього експерименту була достовірно підвищена. У слизовій

оболонці стравоходу, концентрація ТБК-активних продуктів за ЛОС була високою на 7 та 15 добу експерименту, а на 21 добу спостерігалось зниження їх концентрації та наближення до контрольних значень. За умов КОС вміст досліджуваного показника у слизовій оболонці стравоходу на 7 та 15 добу після опіку був вищий за контроль. Після цього вміст ТБК-активних продуктів починає поступово знижуватись, але лишається вище за контрольні значення протягом усього досліджуваного періоду.

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. За опіку підвищується синтез АФК, внаслідок чого пошкоджуються тканини. За розвитку дисбалансу між інтенсивністю вільнорадикальних процесів і активністю антиоксидантної системи (АОС), внаслідок чого підвищується окиснення біомолекул [228]. Порушення рівноваги між окиснювальними процесами, які знаходяться в основі метаболізму всіх систем організму і визначає його адаптивну спроможність до ушкоджуючих факторів, призводить до оксидативного стресу [226, 227, 229]. Отже, за ХОС 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 порушенням механізмів АОЗ пов'язано зі зниженням активності СОД, каталази та системи глутатіону за опіку. Суттєві метаболічні порушення за ХОС, які обумовлені процесами надмірної продукції АФК є умовою для активації протеолізу.

Пацієнти з опіками є більш сприйнятливими до АФК-опосередкованих ушкоджень клітинної ДНК та білків [226, 227], так як у них відбувається порушення про-антиоксидантної рівноваги. Оксид азоту (NO) – це міжклітинна сигнальна молекула, яка бере участь у процесах відновлення ушкоджених тканин. Антиоксидантний ефект NO відбувається завдяки витісненню основного компонента окисного стресу - супероксиду. NO також сприятливо впливає на ангиогенез, запалення, реконструкцію тканин [229], 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 порівняно з контролем, та знижувалась на 21 добу, наближаючись до контрольних значень. У слизовій оболонці стравоходу також відмічено достовірне зростання активності ферменту порівняно з контрольними значеннями. Активність iNOS у сироватці крові та у слизовій оболонці стравоходу за умов опіку достовірно підвищувалась, 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 [227].

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 ХОС.

Протеолітичний баланс у слизовій оболонці за ХОС. Активність ММП при за різних типів загоєння ран активно досліджується [230]. Однак, є

недостатньо експериментальних та клінічних досліджень щодо ролі ММП у загоєнні ран після хімічних опіків саме в тканинах стравоходу. Нами було визначено вміст різних типів ММП (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9) у слизовій оболонці стравоходу за ХОС .

У слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС вміст ММП-1 та ММП-2 був найбільш високим на 7 добу. За умов КОС у слизовій оболонці стравоходу вміст ММП-1 на підвищився на 1 добу. Максимальне значення вмісту ММП-1 у слизовій стравоходу спостерігалось на 21 добу після опіку, відносно контролю. Вміст ММП-2 підвищувався на 1 та 15 добу після опіку у слизовій стравоходу. Вміст ММП-3 за ЛОС у слизовій оболонці стравоходу найбільш високим був на 7 добу, за КОС вміст ММП-3 у слизовій оболонці стравоходу зростав протягом усього досліджуваного періоду, максимальне значення спостерігалось на 21 добу після опіку. Вміст ММП-8 та ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу підвищувався переважно на 7 добу після ЛОС.

Дослідження за КОС вмісту ММП-8 у слизовій оболонці стравоходу виявило підвищення показника 1 добу та зниження на 7 та 15, але залишався вище контрольних значень. Максимальне підвищення показника спостерігали на 21 добу. Вміст ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу зростав на 1 добу та 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.

Отримані результати щодо підвищення вмісту ММП-8 можуть свідчити про суттєву роль даної протеїнази в модулюванні запальної відповіді за КОС. При патологічних процесах порушується динамічна рівновага між активністю протеолітичних ферментів та їх інгібіторами, і це важлива ланка патогенезу великої кількості захворювань [231]. Проте в літературі недостатньо даних щодо активності протеолітичних ферментів та інгібіторного потенціалу у слизовій оболонці за опікових травм стравоходу.

Загальна протеолітична активність у слизовій оболонці стравоходу за ЛОС зростала впродовж всього експерименту порівняно з контрольними значеннями. Серинові та матриксні металопротеїнази є найбільш активними при процесах загоєння. 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, висока активність металопротеїназ та серинових протеїназ на 21 добу за ЛОС свідчать про хронізацію запального процесу та можливість утворення надлишкової грануляційної тканини.

Нами було визначено вміст тканинного інгібітора ММП (ТІМП-1) у слизовій оболонці стравоходу після моделювання ЛОС та КОС. Вміст ТІМП-1 на 7 добу після ЛОС був вище за контрольних значень, на 21 добу знижувався, порівняно з контролем за ЛОС. На 7 добу після КОС даний показник був вище за контролю, 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 [232]. 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 незавиваючих 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 ХОС. Функціонування ММП при нормальних та патологічних загоєннях ран активно досліджується [232, 227]. 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. За умов моделювання ЛОС показано підвищення вмісту ММП-1 та ММП-2 у сироватці крові на 21 добу експерименту, порівняно з контрольними значеннями. Максимальне підвищення вмісту ММП-1 у сироватці крові спостерігали на 1 добу після КОС. 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, порівняно з контрольними значеннями. Вміст ММП-3 у сироватці крові підвищувався за ЛОС. Вміст ММП-3 у сироватці крові суттєво не змінювався, відносно контролю за КОС. За умов ЛОС підвищувався вміст ММП-8 у сироватці крові на 7 та 21 добу, 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, 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. Подібна тенденція спостерігалась при дослідження вмісту ММП-9 за умов КОС. Вміст ММП-9 у сироватці крові був вище контрольних значень на та 7 доби. Найвище значення даний показник мав на 15 та 21 добу. 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. Загальна протеолітична активність у плазмі крові підвищувалась упродовж всього експерименту за ЛОС, порівняно з контрольними значеннями.

Також ми визначили загальну активність протеолітичних ферментів у плазмі крові щурів за КОС. Встановлено, що на 1 та 7 добу експерименту після моделювання КОС загальна активність протеолітичних ферментів. 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) [233]. 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 та металопротеїназ у плазмі крові підвищувалась за умов ЛОС на 7, 15 та 21 добу, порівняно з контрольними значеннями.

Визначено активність серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові щурів за КОС. Активність металопротеїназ у плазмі крові щурів підвищувалась поступово. Підвищення активності металопротеїназ після опіку може бути пов'язано з розвитком запальних процесів та надходженням протеїназ із зруйнованих тканин та клітин [234, 235]. На 15 та 21 добу активність металопротеїназ знизилась відносно контрольних показників. Подібна тенденція спостерігалась при визначенні активності серинових протеїназ.

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 [234, 235].

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-кробуліну 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 плазміногену та перехід його в плазмін. Унаслідок цього відбувається надмірне зростання активності плазміну та його аутокаталіз.

Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов ХОС. Реакціям протеолізу належить ключова роль не тільки в регуляції внутрішньоклітинного обміну білків, але й у таких процесах як їх транслокація всередині й поза межами клітини, вони беруть участь в утворенні активних ферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Висока активність протеолітичних ферментів контролюється білковими інгібіторами, які утворюють стійкі інактивовані комплекси з ферментами. Активні ферменти самі можуть бути активаторами інших ензимів, формуючи складні й багатокomпонентні каскади активації, які регулюють велику кількість метаболічних шляхів [236]. Тому, порушення

балансу між активаторами та інгібіторами ферментних каскадів впливає на функціонування всього організму в цілому, тому, це можна назвати молекулярною основою численних патологічних процесів [236].

При виділенні трипсиноподібних серинових протеїназ з плазми крові щурів за умов ЛОС, було показано підвищення концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові за умов ЛОС, порівняно з контролем. Зростання концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові щурів може бути пов'язано з розвитком оксидативного стресу. Оксидативний стрес розвивається в наслідок хімічного опіку стравоходу, що зумовлює пошкодження клітинних мембран і вихід протеїназ у кровотік, а також можливим зниженням синтезу інгібіторів протеолізу [52].

Проаналізувавши дані ензим-форезу трипсиноподібних серинових протеїназ було показано, підвищення кількості низькомолекулярних активних протеолітичних ферментів, що утворились при деградації плазміну. 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. Різноюнаправлені зміни можуть вказувати на 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. Важливо відмітити, що отримана фракція з'являлась за лужного опіку, у контрольних пробах фракції, яка

відповідає плазміну не було виявлено. Такі зміни може свідчити про надмірну протеолітичну активність плазміну за умов опіку, що призводить до його деградації. Також встановлено, що за умов опіку стравоходу відбувається утворення низькомолекулярних фракцій з М.м 74, 54, 43, 36, 23 кДа. Фракція з М.м 23 кДа може відповідати еластазі. Нами 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. 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. Таким чином, у залежності від місця розщеплення цих молекул ММП-9 може знижувати або підвищувати їх біологічну активність [237]. Було показано, що за умов ЛОС спостерігається наявність фракції, що може відповідати ММП-9 протягом всього експерименту порівняно з контрольними значеннями.

Також на ензимограмі була виявлена фракція з М.м. 20 кДа, що може відповідати ММП-7, яка відноситься до класу матрилізинів. Дана МП одна з найменших мелатопроїназ, вона складається з про-домену та каталітичного домену. ММП-7 експресується за нормальних та патологічних умов [238, 239, 237]. Експериментальними дослідженнями було встановлено, 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 [238, 239, 237].

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 підвищення вмісту фракцій з М.м. 168 та 150 кДа на протягом 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 протягом всього експерименту. Так на 7 добу вміст був нижчим за контрольні значення. Зниження вмісту альбумінів, може свідчити про порушення функцій печінки, оскільки саме в печінці йде активний синтез альбумінів [240]. 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 порушується баланс між протеїназами та їх інгібіторами. Показано підвищення протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Спостерігалось зростання низькомолекулярних форм плазміну, що утворилася за надмірної його активації.

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 [241]. 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.

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. 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 [234, 242]. Показано, що за умов ЛОС вміст IgG підвищувався на 7, 15 добу, та особливо високими значення були на 21 добу, порівняно з контрольними значеннями. 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, 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 [246, 244].

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 [246, 244]. 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. 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 [246, 244; 245], 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 КОС 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 ензимограми у слизовій оболонці стравоходу нами була виявлена фракція,

яка може відповідати ММП-7, яка є прогностичним маркером злякисного 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 (IgG). Таким чином, порушення процесів протеолізу (та його циклічний характер), а також підвищена концентрація нетипових форм білків негативно впливає на процеси регенерації.

Процеси загоєння за умов ХОС. Нами було визначено біохімічні показники, стан АОС, досліджено імунну відповідь. Наступним кроком ми підтвердили наявність запального процесу на молекулярному рівні, а також активацію різноманітних молекул на рівні експресії генів.

Циклооксигенази/ендопероксид синтази простагландину (Cox / Ptgs 1 & 2) генерують простагландини, які є сигнальними молекулами у запальних процесах а також беруть участь у регуляції судинного тонуусу, тромбозу [248]. 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 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 на 7 і 15 добу загоєння відповідно, в порівнянні з контролем. На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

Трансформаційний фактор росту бета (Tgfb), має ряд функцій, він здатен контролювати цілий спектр реакцій. Tgfb впливає на диференціювання, клітинну проліферацію, міграцію, апоптоз, позаклітинну реконструкцію та розвиток позаклітинного матриксу. Tgfb грає важливу роль у процесі загоєння рани. Фактор росту безпосередньо після ушкодження у великій кількості вивільняється з дегранульованих тромбоцитів, виконуючи функцію хемоаттрактанта для лімфоцитів, фібробластів і нейтрофілів [247].

Рівень експресії гена *Tgfb1* у слизовій оболонці стравоходу в групі тварин з ЛОС був вищим 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 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 сімейство поліпептидів, основна функція яких стимулювання мітозу в різних типах клітин, поділу фібробластів, судинних ендотеліальних клітин та кератиноцитів *in vitro*, формування нових судин та утворення грануляційної тканини [227]. 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.

При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу в групах з ЛОС виявили запальний процес та присутність інфільтрації лейкоцитами, окрім цього відбувалося патологічне приростання серозної оболонки стравоходу до тканин трахеї. На 15 добу за ЛОС зафіксували зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації. Також за ЛОС на 21 добу спостерігали хаотичне укладання й підвищення кількості волокон колагену в підслизовій основі стравоходу, що може бути сигналом патологічного процесу загоєння та початковою фазою розвитку фіброзу.

Таким чином аналізуючи регенеративні процеси за умов ХОС 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 ХОС присутня залишкова інфільтрація лейкоцитами та надмірне утворення сполучної тканини (рис.7.1)

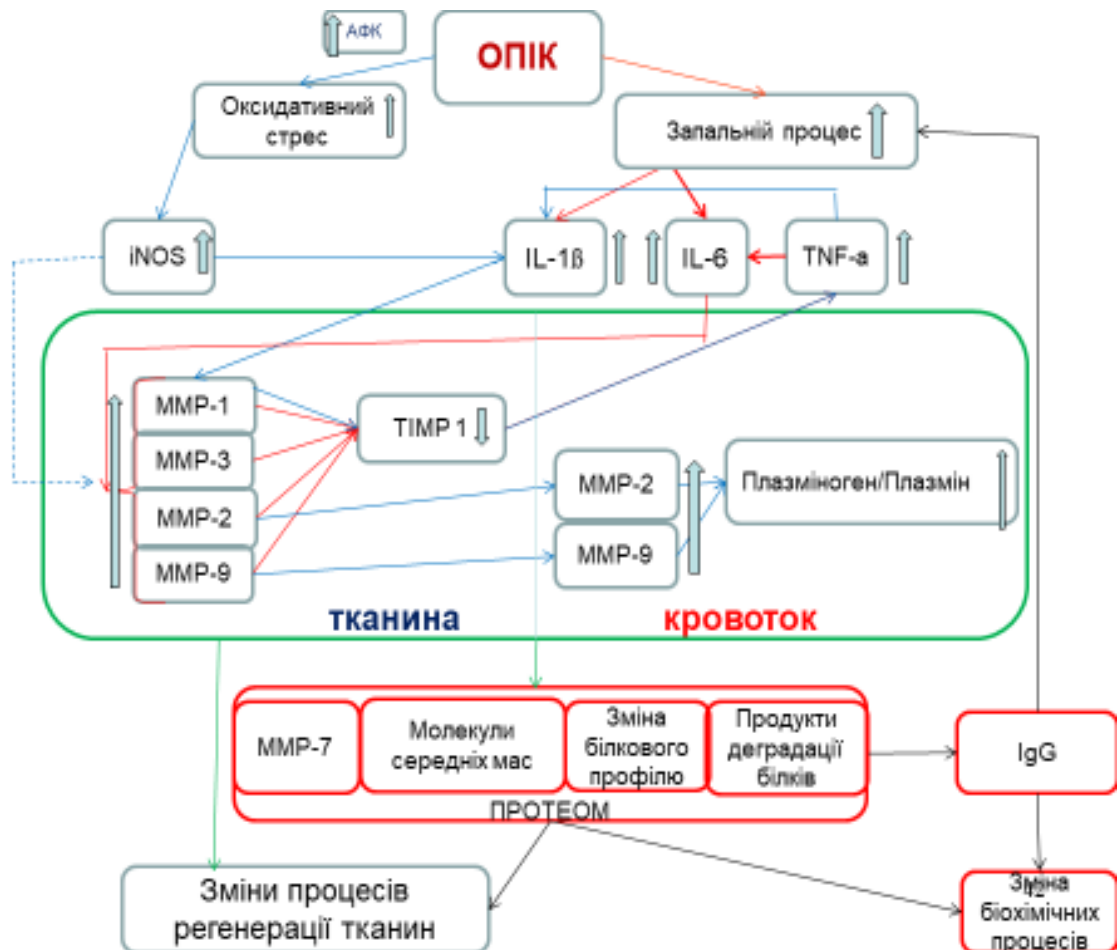


Рис.7.1 Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу

Потенційні наслідки виникнення дисфункціонування в системі протеолізу, що призводять до змін у білковому складі тканин організму за умов опіку стравоходу та за введення меланіну. За визначення концентрації трипсиноподібних серинових протеїназ у плазмі крові було показано, що її підвищення за умов ЛОС на 7 добу та зменшення на 15 та 21 добу, порівняно з контролем.

За умов введення меланіну за ЛОС концентрація трипсиноподібних серинових протеїназ була нижчою на 7 добу, порівняно з групою тварин лише з ЛОС. 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 та у слизовій оболонці стравоходу, порівняно з показниками за ЛОС. Було показано, що за умов ЛОС підвищувався рівень МСМ та олігопептидів у всіх досліджуваних зразках, максимальне зростання даних показників було на 7 та 15 добу дослідження, що відповідає стадії токсемії та септикотоксемії. Високі концентрації МСМ та олігопептидів може залежати від надмірної активації протеолітичних процесів, які спричинюють підвищене утворення різних типів білків та фрагментів білкових молекул. А також, внаслідок підвищення окисної модифікації білків, та може бути компенсаторною реакцією організму на патологічний процес.

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

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. 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. Опік стравоходу 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 порушувався баланс між протеїназами та їх інгібіторами в плазмі крові, зростала протеолітична активність та активність інгібіторів протеїназ. Показано підвищення утворення низькомолекулярних форм плазміну, що може свідчити про надмірну його активацію. Меланін знижував активність протеїназ та їх інгібіторів, та нормалізував протеолітичні процеси. При аналізі якісного складу серинових ферментів за ЛОС та меланіну ми спостерігали відсутність деградованих форм плазміну та нейтрофільної еластази, що може свідчить 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 ензімограми у слизовій оболонці стравоходу нами не була виявлена фракція, яка може відповідати ММП-7. Нами був визначений вміст фракції IgG у сироватці за ЛОС за введення 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 ХОС та за введення меланіну. При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу в групах з ЛОС за введення меланіну було помітне зниження інфільтрації лейкоцитами, всіх 3-х

оболонок стравоходу, як наслідок - нижчий рівень запалення порівняно з показниками у тварин з ЛОС. На 15 добу у тварин з ЛОС за умов введення меланіну присутність лейкоцитів повністю знівельована, порівняно з ЛОС. На 21 добу досліджень за ЛОС за умов застосування меланіну 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 введенні меланіну. Станом на 21 добу за опіку стравоходу рівень ФРФ знижувався, порівняно з контролем. За введення меланіну на 21 добу рівень ФРФ зростав порівняно з показниками за лужного опіку та наближався до контрольних значень.

Таким чином, представлені дані показують, що за умов ХОС відбувається порушення балансу між протеїназами та їх інгібіторами. 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 ензимограми 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 (рис.7.2).



Рис.7.2 Корекція потенційних наслідків виникнення дисфункціонування в системі протеолізу

Визначений рівень експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* за умов ЛОС та за введення меланіну у крові та слизовій оболонці стравоходу, показано зниження досліджуваних показників протягом всіх термінів порівняно з ЛОС. Визначений відносний вміст фактору росту фібробластів за ЛОС та за введення меланіну, показано зростання вмісту на 21 добу порівняно з ЛОС. При гістохімічному та морфометричному аналізі було оцінено вплив меланіну на дані процеси, показано менш виражене утворення колагенових волокон в ушкоджених тканинах стравоходу, що вказує на протизапальні та антифіброзні властивості цієї речовини. При гістологічному дослідженні показано, що у зразках які були отримані від тварин з ЛОС, які вживали меланін не відбувалося патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу, відбувається відновлення уражених тканин стравоходу вже на 21 добу.

## 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 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 ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Colton B. Nielson, Nicholas C. Duethman, James M. Howard, Michael Moncure, John G. Wood. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *Journal of Burn Care & Research*. 2017; 38:469–482.
2. Abaskharoun, Ramy & Depew, William & Hookey, Lawrence. Nonsurgical Management of Severe Esophageal and Gastric Injury Following Alkali Ingestion. *Canadian journal of gastroenterology. Journal canadien de gastroenterologie*. 2010; 21: 757-60.
3. Friedrich LT Sun, S Natesan, DO Zamora, RJ Christy, NR Washburn. Effects of hyaluronic acid conjugation on anti-TNF- $\alpha$  inhibition of inflammation in burns. *Journal of biomedical materials research*. 2017; 102 (5): 1527-1536.
4. Голубев А.М., Мороз В.В., Сундуков Д.В. Патогенез острого респираторного дистресс-синдрома. *Общая реаниматология*. 2012; 8(4) :13.
5. Козинець, Г. П. Сучасне визначення сепсису та септичного шоку у хворих з глибокими поширеними опіками. *Хірургія України*. 2017; 1: 109-117.
6. Akpınar K. The measurement of serum TNF- $\alpha$  levels in patients with lichen planus. *Acta Dermatovenerol APA*. 2017; 26: 85-88.
7. Нетюхайло Л. Г. С. В. Харченко, А. Г. Костенко Патогенез опікової хвороби (частина II). *Світ медицини та біології*. 2011; 1: 131-135.
8. Auger C., Samadi O., Marc G. Jeschke. The biochemical alterations underlying post-burn hypermetabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2017; 1863: 2633-2644.
9. Pastar I., Stojadinovic O., Yin NC., Ramirez H., Nusbaum AG., Sawaya A., et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care*. 2014; 3: 445–64.

10. Dhopte A., Tiwari V. K., Patel P., Bamal R. Epidemiology of pediatric burns and future prevention strategies—a study of 475 patients from a high-volume burn center in North India. *Burns Trauma*. 2017; 5: 1.
11. Zhao, J. Cell. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Mol. Life Sci*. 2007; 3017: 286-295.
12. Breton, J., Veinante, P., Uhl-Bronner, S. et al. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain*. 2008; 4 (19): 28-29.
13. Шахмамедов Н. Современные комплексные методы диагностика рака пищевода различной локализации. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії*. 2012; 12.1-2 (37-38): 286-295.
14. Costantini Todd W. Thrama, a human-specific and partially duplicated  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor gene with the potential to specify a human specific inflammatory response to injury. *Journal of leukocyte biology*. 2015, 97.2: 247-257.
15. Sheriff, Sulaiman, et al. Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012, 351.2: 286-295.;
16. Іліка, В. В.; Давиденко, І. С. Імуногістохімічне вивчення проапоптотичного протеїну бах в децидуоцитах базальної пластинки плаценти при базальному децидуїті в поєднанні з залізодефіцитною анемією вагітних. 2018; 4.326: 9.
17. Портнова, М. М. Особенности ожогов глаз при воздействии на них щелочного агента. *Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области*. 2017; 19: 286-295.
18. Агапова Ю. Р., Гулин В., Малышева Е. Аутоиммунный генез дисбаланса системы протеолиза при бронхолегочной патологии. *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки*. 2012; 17.3: 286-295.

19. Сидельникова, В. И., Черницкий А. Е., М. И. Рецкий. "Эндогенная интоксикация и воспаление: последовательность реакций и информативность маркеров. Сельскохозяйственная биология. 2015; 2: 286-295.
20. 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.
21. Koval TV., Ishchuk TV., Grebinyk DM., Raetska Ya B., Sokur OV., Savchuk OM., Ostapchenko LI. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn. Biomedical Research. 2018; 29 (16): 3169-3173
22. 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
23. Chromy, Brett A. Wound outcome in combat injuries is associated with a unique set of protein biomarkers. Journal of translational medicine. 2013; 11.1: 281.
24. Nahm J. A personalized query expansion approach for engineering document retrieval. Advanced Engineering Informatics. 2014; 28.4: 344-359.
25. Mindaugas L., Viskelis, Pranas R., Raimondas K., Darius U., Norbertas J. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Malus domestica Leaves. The Scientific World Journal. 2014; 10: 1155.
26. Beregova TV, Neporada KS, Skrypnyk M, Falalyeyeva TM, Zholobak NM, Shcherbakov OB, Spivak MY, Bubnov RV. Efficacy of nanocerium for periodontal tissues alteration in glutamate-induced obese rats-multidisciplinary considerations for personalized dentistry and prevention. EPMA J. 2017 Mar 14;8(1):43-49
27. Alov A., Petko O., Tsakovska I. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. Current topics in medicinal chemistry. 2015; 15.2: 85-104.

28. Цирюк, О. І.; Берегова, Т. В. Перспектива застосування агоністів PPAR $\gamma$  меланіну та піоглітазону при тривалій гіпоацидності шлунка. Український антарктичний журнал. 2015; 1: 23.
29. Taburets O., Morgaienko O., Kondratiuk T., Beregova T., and Ostapchenko L. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. RJPBCS. 2016; 7(3): 2031-286-295.
30. Dranitsina, A., Dvorshchenko, K., Taburets, O., Grebinyk, D., Ostapchenko, L., & Beregova, T. Tlr2, Tjp1 genes expression during wound healing dynamics—with melanin treatment. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2017; 30(2), 81-85.
31. Чижанська, Н. В., Цирюк О., Берегова Т. Рівень кортизолу в крові щурів до та після стресу на фоні дії меланіну. Вісник проблем біології і медицини. 2007; 1: 40-44.
32. Голишкін, Д. В. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунка щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Вісник проблем біології і медицини. 2010; 1: 47-52.
33. Smolle C., Cambiaso-Daniel J, Forbes A, Wurzer P. Recent Trends in Burn Epidemiology Worldwide: A Systematic Review. Burns. 2017; 43(2): 249–257.
34. Moore, E., Bennet, K., Dietrich, M. & Wells, N. The Effect of Directed Medical Play on Young Children's Pain and Distress During Burn Wound Care. Journal of Pediatric Health Care. 2015; 29(3): 265–273.
35. 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.
36. Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. Wound Repair Regen 2009; 17: 817-24.

37. Jin Y, Ling PX, He YL, Zhang TM. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. *Burns* 2007; 33: 1027-31.
38. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 857-79.
39. Travis TE, Mauskar NA, Mino MJ, Prindeze N, et al. Commercially available topical platelet-derived growth factor as a novel agent to accelerate burn-related wound healing. *J Burn Care Res* 2014; 35: 321-9.
40. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PloS One* 2014; 9: 88348.
41. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis R., Kviklys D., Uselis N., Janulis V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *Sci. World J.* 2014; 306217.
42. Miller MC, Nanchahal J. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. *BioDrugs.* 2005; 19: 363–81.
43. Hettiaratchy Sh., Dziewulski P. Pathophysiology and types of burns. *BMJ.* 2004 Jun 12; 328(7453): 1427–1429.
44. Закон "Про захист тварин від жорстокого поводження". Верховна Рада України. *Відомості Верховної Ради України.* 2006; 27: 13.
45. Rozemond H. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act. *The Veterinary quarterly.* 1986; 8(4): 346–349.
46. 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 лущиння *P. Vulgaris* *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.* 2017; 1(22): 36-39.
47. Міністерство охорони здоров'я України; <http://moz.gov.ua>

48. Arévalo-Silva S, Scarpignato C. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: A comprehensive review. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(25): 3918-3930.
49. Arévalo-Silva C, Eliashar R, Wohlgeleinter J, Elidan J, Gross M. Ingestion of caustic substances: a 15-year experience. *Laryngoscope*. 2006; 116: 1422-1426.
50. Türkyilmaz Z, Sönmez K, Karabulut R, et al. Mitomycin C decreases the rate of stricture formation in caustic esophageal burns in rats. *Surgery* 2009; 145:219-25.
51. Ocakci A, Kanter M, Cabuk M, et al. Role of caffeic acid phenetyl ester, an active component of propolis, against NaOH-induced esophageal burns in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 1731-9.
52. Senturk E, Pabuscu E, Sen S, et al. Comparison of mitomycin-c and heparin affects in experimental corrosive esophagitis on rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; 75:785-9.
53. Kay M, Wyllie R. Caustic ingestions in children. *Curr Opin Pediatric* 2009; 21: 651-4.
54. Nakajima Y., Nakano Y., Fuwano S. Effects of three types of Japanese honey on full-thickness wound in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 11-15.
55. Александрова А.В. Влияние доксициклина на общую протеолитическую активность при экспериментальном лечении термического ожога. *Таврійський медико-біологічний вісник*. 2012; 1(59): 15-17.
56. Widgerow AD. Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control. *Wound Repair Regen*. 2011; 19: 117–33.
57. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341: 738.
58. Lo CH, Akbarzadeh S, McLean C, Ives A, Paul E, Brown WA, Cleland H. Wound healing after cultured epithelial autografting in patients with massive burn injury: A cohort study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018; 111-1116.
59. Matthew P. R, Leopoldo C. C. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care*. 2015; 122-8.

60. Фісталь Е.Я., Козинець Г.П., Самойленко Г.Є. Комбустіологія. 2004; 184.
61. 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.
62. Kiyani G, Aktas S, Ozel K. Effects of hyperbaric oxygen therapy on caustic esophageal injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2004; 39: 1188-93.
63. 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
64. Kilincaslan H., Ozgun H., Elif Kilic K. Beneficial Effects of Methylene Blue on the Acute Phase of Corrosive Esophageal Burn in Rats. *European journal of pediatric surgery.* 2014; 7-15.
65. Greenhalgh D. G. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. *Burns & Trauma.* 2017; 10-20
66. Contini S., C. Scarpignato. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: A comprehensive review. *World J Gastroenterol.* 2013; 19 (25): 3918-3930.
67. Chibishev A., N. Simonovska, A. Shikole. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract. *Prilozi.* 2010; 31, №1: 297– 316.
68. Abaskharoun R.D., W.T. Depew, L.C. Hookey, Can. J. Nonsurgical management of severe esophageal and gastric injury following alkali ingestion. *Gastroenterol.* 2007; 21, №11: 757–760.
69. Devereaux A., D.E. Amundson, J.S. Parrish. Vesicants and nerve agents in chemical warfare. Decontamination and treatment strategies for a changed world. *Postgrad Med.* 2002; 112, № 4: 90 -96.
70. Contini S., M. Tesfaye, P. Picone. Corrosive esophageal injuries in children: a shortlived experience in Sierra Leone. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2007; 71, № 10: 1597–1604.

71. Mattos G.M., D.D. Lopes, R.C. Mamede Effects of time of contact and concentration of caustic agent on generation of injuries. *Laryngoscope*. 2006; 116, № 3: 456–460.
72. Ramasamy K., V. Gumaste. Corrosive Ingestion in Adults. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2003; 37, №2: 119–124.
73. Kim D., R. Lee, J. Kim. Epidemiology of Burns in Korea from 2010 to 2014. *J Korean Burn Soc*. 2015; 1: 1–6.
74. Karunadasa K.P., C. Perera, V. Kanagaratnum. Burns due to acid assaults in Sri Lanka. *J. Burn Care Res*. 2010; 31, №5: 781-785.
75. Григоренко АП, Козий МН, Куприн СЮ. Метаболические нарушения и их коррекция у больных с тяжелой ожоговой травмой. *Вестник интенсивной терапии*. 2007; 4: 51–3.
76. Ратнер Г.Л., Белоконов О. Ожоги пищевода и их последствия. М: *Медицина*. 1982; 1: 160.
77. Chirica M., M. Resche-Rigon , N.M Bongrand. Surgery for caustic injuries of the upper gastrointestinal tract. *Ann Surg*. 2012; 256: 994– 1001.
78. Blatnik D. S., Toohill R. J., R. H. Lehman. Fatal complication from an alkaline battery foreign body in the esophagus. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997; 5: 611–615.
79. Rajabi M.T., G. Maddah, R. Bagheri. Corrosive Injury of the Upper Gastrointestinal Tract: Review of Surgical Management and Outcome in 14 Adult Cases. *Otorhinolaryngol*. 2015; 27, № 78: 15-21.
80. Reed J.L., W.J. Pomerantz. Emergency Management of Pediatric Burns. *Pediatric Emergency Care*. 2005; 21№ 2: 118-129.
81. Chibishev A., N. Simonovska, A. Shikole. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract. *Prilozi*. 2010; 31 №1: 297– 316.
82. Velnar T., Bailey T., V. Smrkolj. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2009; 37 №5: 1528–1542.

83. Rubartelli A., R. Sitia. Stress as an Intercellular Signal: The Emergence of Stress-Associated Molecular Patterns (SAMP). *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 11 №10: 2621-2629.
84. Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. of Leukocyte Biology*. 2005; 81, 1: 1-5.
85. Cordeiro J.V., Jacinto A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013; 14: 249–262.
86. Koha T.J., DiPietro L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2011; 13: 23–35.
87. Lau T.T., D.-A. Wang. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011; 11 №2: 189–197.
88. Reinke J.M., Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res*. 2012; 49: 35–43.
89. Mills S.J. A.J. Cowin, P. Kaur. Pericytes, Mesenchymal Stem Cells and the Wound Healing Process. *Cells*. 2013; 2 №3: 621–634.
90. Jackson W.M., L.J. Nestia, R.S.T. Concise. Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Trans Med* January. 2012; 1 №1: 44-50.
91. Behm B., P. Babilas, M. Landthaler. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *European Journal of Pharmacology*. 2012; 26 №7: 812–820.
92. Darby I.A., B. Laverdet, F. Bonté. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014; 7: 301–311.
93. Al-Attar A. Keloid pathogenesis and treatment. *Plast. Reconst. Surg*. 2006; 117 № 1: 286–300.
94. Жукова О., Н. Потекаев, А. Стенько. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи. *Клинич. дерматология и венерология*. 2009; 3: 4–9.

95. Profyris C., C. Tziotzios, I. Do Vale. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012; 66, №1: 1–10.
96. Абаев Ю. К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. Ростов: Феникс. 2006; 1: 427.
97. Palao R., I. Monge , M. Ruiz Chemical burns: pathophysiology and treatment. *Burns*. 2010; 36, №36: 295–304.
98. Gumaste V.V., Dave P.B. Ingestion of corrosive substances by adults. *Am. J. Gastroenterol*. 1992; 87: 1–5.
99. Gadea V., D. Petrescu, A. Bosman. Our attitude in esophageal and gastric post-caustic lesions. *Chirurgia (Bucur)*. 2000; 95 № 3: 273–277.
100. Usta M., T. Erkan, F. Cokugras High Doses of Methylprednisolone in the Management of Caustic Esophageal Burns. *Pediatrics*. 2004.
101. Zee van der D., C. Hulske. Indwelling esophageal balloon catheter for benign esophageal stenosis in infants and children. *Surgical Endoscopy* pril. 2014; 28 № 4: 1126-1130.
102. Lee W.C., T.H. Lee, J.-H. Cho. White Esophageal Mucosa and Black Gastric Mucosa: Upper Gastrointestinal Injury Due to Hydrochloric Acid Ingestion. *Clin. Endosc*. 2014; 47 №1: 119–120.
103. Contini S., A. Swarray-Deen, C. Scarpignatoc. Oesophageal corrosive injuries in children: a forgotten social and health challenge in developing countries. *Bull World Health Organ*. 2009; 87. 12: 950–954.
104. Ghatak Sh., E. V. Maytin, J. A. Mack Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in wound healing and fibrosis. *Int J Cell Biol*. 2015; 10: 1155.
105. 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.

106. Gill S.E., W.C. Parks. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int Journ. Biochem. Cell. Biol.* 2008; 40(6): 1334 – 1347.
107. Bergers G., R. Brekken, G. McMahon Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology.* 2000; 2: 737 – 744.
108. Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol.* 2005; 9: 267–285.
109. Sledge G.W. VEGF-targeting therapy for breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2005; 10, 4: 319 – 323.
110. 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.
111. Голосная Г. С. Роль ингибиторов апоптоза в диагностике и прогнозировании исходов перинатальных гипоксических поражений головного мозга у новорожденных. *Педиатрия.* 2005; 3: 29 – 35.
112. Соболева Г. М., Г. Т. Сухих. Семейство матриксных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль. *Акушерство и гинекология.* 2007; 1: 5 – 7.
113. Франк Г. А., Л. Э. Завалишина, Ю.Ю. Андреева. Состояние внеклеточного матрикса и маркеры адгезии в уротелиальном раке мочевого пузыря. *Архив патол.* 2005; 67, № 3: 11 – 14.
114. Gill S.E., W.C. Parks. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int Journ. Biochem. Cell. Biol.* 2008; 40, № 6: 1334 – 1347.
115. Bergers G., R. Brekken, G. McMahon Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology.* 2000; 2: 737 – 744.
116. Шойхет Я. Н., Кореновский , Ю.В., Мотин Ю.Г. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких. *Проблемы клинической медицины.* 2008; 3: 99–102.
117. Абаев Ю.К. Биология заживления острой и хронической раны. *Медицинские новости.* 2003; 6: 3-10.

118. 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.
119. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341: 738.
120. Lo CH, Akbarzadeh S, McLean C, Ives A, Paul E, Brown WA, Cleland H. Wound healing after cultured epithelial autografting in patients with massive burn injury: A cohort study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018; 13.
121. Matthew P. R, Leopoldo C. C. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care*. 2015; 1: 12.
122. Ішук 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.
123. Dipietro LA, Reintjes MG, Low QE, Levi B, Gamelli RL. Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1. *Wound Repair Regen*. 2001 Jan-Feb; 9(1): 28-33.
124. Pérez-Guisado J, de Haro-Padilla JM, Rioja LF, Derosier LC, de la Torre JJ. Serum albumin levels in burn people are associated to the total body surface burned and the length of hospital stay but not to the initiation of the oral/enteral nutrition. *Int J Burns Trauma*. 2013 Jul 8; 3(3):159-63.
125. Брус ТВ, Хайцев НВ, Кравцова АА. Дисфункция печени в патогенезе ожоговой болезни и ее коррекция сукцинатсодержащими препаратами. *Педиатр*. 2016; 7(4): 132-41.
126. Веґа А, Егіпто Р, Карвалу Д, Корреиа Ф, Олівейра В, Родригуес А, Амаранте Ж, Медина ЖЛ. Nitrogen balance assessment in burn patients. *Acta Med Port*. 2010 Sep-Oct; 23(5):8 83-90.
127. Su GL, Huang WX, Chen J, Xue DJ, Zhou JJ. Effects of different fluid resuscitation program on renal function in mice during the hockstage of severe burn. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2016 Nov 20; 32(11): 681-7.

128. Ефременко ЮР. Протеолитические ферменты высокочувствительный критерий эффективности и безопасности лечения. Биомедицинская химия. 2008; 54(3): 179 - 83.
129. Ежова ГП, Бабаев АА, Новиков ВВ. Биоинформационные аспекты протеомики и деградации белка. Нижний Новгород. 2007; 1: 86.
130. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Research*. 2018; 46(1): 624–32.
131. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016; 31(1):177-83.
132. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O’Dell JR. *Textbook of Rheumatology*. 2017. Chapter 8, Proteinases and Matrix Degradation; p. 106-25.
133. Stoller JK, Aboussouan LS.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005; 365: 2225–36.
134. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models and Mechanisms*. 2014; 7: 193-203.
135. Tsuchiya T, Osaki T, Minamino N, Sasaki K. Peptidomics for studying limited proteolysis. *J Proteome Res*. 2015 Nov 6; 14(11): 4921-31.
136. Яровая ГА. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза III. Физиологическая роль и биохимические механизмы протеолитической деградации белков. *Лабораторная медицина*. 2002; 5:39-45.
137. Shahcorresponding D, Mital K. The Role of Trypsin:Chymotrypsin in Tissue Repair. *Adv Ther*. 2018; 35(1): 31–42.
138. Звягинцева ТВ, Халин ИВ. Метаболитотропная терапия хронических ран. Харьков. 2011; 1: 182.

139. Han SK. Innovations and advances in wound healing. Heidelberg: Springer. Basics of wound healing. 2016; 1: 1–37.
140. Rayment EA, Upton Z. Finding the culprit: a review of the influences of proteases on the chronic wound environment. *Int J Low Extrem Wounds*. 2009; 8(1): 19-27.
141. Sabino F, Hermes O, Egli FE, Kockmann T, Schlage P, Croizat P, et al. In vivo assessment of protease dynamics in cutaneous wound healing by degradomics analysis of porcine wound exudates. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2015 Feb 1; 14(2): 354-70.
142. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016 Sep-Oct; 91(5): 614-20.
143. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Sep 1; 4(9): 560-82.
144. McCarty SM, Perciva SL. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013 Oct; 2(8): 438–47.
145. Яровая ГА. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза. Физиологическая роль и биохимические механизмы реакций ограниченного протеолиза. *Лабораторная медицина*. 2005; 7: 81-9.
146. Bell RA, Al-Khalaf M, Megeney LA. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skeletal Muscle*. 2016; 10: 1186.
147. Lecker SH, Mitch WE. Proteolysis by the ubiquitin-proteasome system and kidney disease. *JASN*. 2011 May; 22(5): 821-4.
148. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol*. 2017 Nov 10; 429(22): 3500-24.
149. Бунеева ОА, Медведев АЕ. Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах. *Биомедицинская химия*. 2018; 64(2): 134-48.
150. Мельников ЭЭ, Ротанова ТВ. Молекулярные шапероны. *Биоорганическая химия*. 2010; 36(1): 5-14.

151. Соколик ВВ. Роль шаперонов в реализации конформационных болезней неврологического профиля. Український вісник психоневрології. 2007; 15(1(50, додаток)): 114-5.
152. М.В. Макаренко, Д.А. Говсеев, Л.Л. Сидорик. Шаперонины как регуляторы нормального и патологического антистрессового ответа в репродуктивной системе человека ЗДОРОВЬЕ ЖЕНЩИНЫ. 2016; №5 (111): 5921
153. Hartl F.U. Molecular chaperons in cellular protein folding. Nature. 1996; 381: 571–580.
154. Quintana FJ., Cohen IR. The Hsp60 immune system network. Trends in Immunol. 2011; 32, № 2: 89–95.
155. Basu S., Srivastava P.K. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune response. Cell Stress Chaperons. 2000; 5, № 5: 443–451.
156. Garrido C., Gurbuxani S., Ravangan L., Kroemer G. Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell
157. Очеретнюк А. О. Вплив гіперосмолярного колоїдного розчину НАЕСЛХ 5% на динаміку змін рівня ендогенної інтоксикації та запалення в організмі щурів у гострому періоді опікової хвороби. Клінічна фармація. 2015;19 № 4: 58-61.
158. Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. Wound Repair Regen 2009; 17: 817-24.
159. Jin Y, Ling PX, He YL, Zhang TM. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. Burns 2007; 33: 1027-31.
160. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther 2011; 9: 857-79.

161. Travis TE, Mauskar NA, Mino MJ, Prindeze N, et al. Commercially available topical platelet-derived growth factor as a novel agent to accelerate burn related wound healing. *J Burn Care Res* 2014; 35: 321-9.
162. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PloS One* 2014; 9: 88348.
163. Taburets OV., Morgaienko OO., Kondratiuk TO., Beregova TV., and Ostapchenko LI. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. *RJPBCS*. 2016; 7(3): 2031.
164. Чижанська Н.В. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Рівень кортизолу в крові щурів до та після стресу на фоні дії меланіну. *Вісник проблем біології і медицини*. 2007; 1: 40-44.
165. Голишкін Д. В., Фалалєєва Т. М., Непорада К. С., Берегова Т. В. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу. *Фізіологічний журнал*. 2015; 61 № 2: 65-72.
166. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis R., Kviklys D., Uselis N., Janulis V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *Sci. World J.* 2014; 306217.
167. Сенюк О. Ф., Горовой Л. Ф., Паламар Л. А. Влияние меланин-глюканового комплекса, выделенного из грибов трутовика, на продолжительность жизни самок мышей линии ICR. *Пробл. старения и долголетия*. 2014; 23 (1): 11–27.
168. Kazi A., Daniel K.G., Smith D.M., Kumar Q.P. Inhibition of the proteasome activity, a Novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis in inducing ability of genistein. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66: 965–976.
169. Голишкін Д. В., Фалалєєва Т. М., Кухарський В. М., Чижанська Н. В., Берегова Т. В. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунка

- щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Вісник проблем біології і медицини. 2010; 1: 47-52.
170. Carletti G., Nervo G., Cattivelli L. Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms. *Int. J. Biol. Sci.* 2014; 10: 1159
171. Watt R, Bothma JP, Meredith P. The supramolecular structure of melanin. *Soft Matter.* 2009; 5:3754-3760.
172. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93: 931–940.
173. Meredith P., Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin *Pigment Cell Res.* 2006; 19, № 6: 572-594.
174. Собко В.М., Мартинюк В.С., Гудкова Д.О. Протекторна дія меланіну на пероксид-індуковане ушкодження та запрограмовану загибель тимоцитів в умовах впливу електромагнітного поля частотою 8 Гц. *Фізика живого.* 2010; 18 (1): 65-70.
175. Дружина М.О., Пухова Г.Г., Бурлака А.П., Жданова Н.М., Сидорик Є.П. Процеси перекисного окиснення в системі крові та їх корекція меланіном у тварин в зоні впливу аварії на Чорнобильській АЕС. *Укр. радіол. журн.* 1994; 4: 271—273.
176. Ozato K, Tsujimura H, Tamura T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques, Suppl.* 2002; 66.
177. Кухарський В.М., Чижанська Н.В., Цирюк О.І. Про залучення рецепторів активації проліферації периксисом гама в механізм антивиразакової дії меланіну, виділеного з антарктичних дріжджів. *Український антарктичний журнал.* 2009; 8: 370-373
178. Дігтяр В. А., Барсук О. М., Камінська М. О., Гладкий О. П., Галаган А. А. Лікування хімічних опіків стравоходу у дітей. *Paediatric Surgery.* 2017; 3(56): 54-56.

179. Dash S., Bhojani J., Sharma S. A Rare Case of Anal and Perianal Chemical Burn in a Child due to Potassium Permanganate Crystals Drug. *Saf Case Rep.* 2018 Dec; 5: 10-15.
180. Moore, E., Bennet, K., Dietrich, M. & Wells, N. The Effect of Directed Medical Play on Young Children's Pain and Distress During Burn Wound Care. *Journal of Pediatric Health Care.* 2015; 29(3): 265–273.
181. Raetska Ya, Ishchuk T., Dzhus O., Savchuk O., Ostapchenko L., Biochemical and immunological blood parameters in dynamic sunderesophagealacidburnmodelof 2nd degree. *FEBS EMBO.*, August September, Paris, France, 2014. –P. 619.
182. Brown TS., Safford S., Caramanica J., Elster EA. Biomarker use in tailored combat casualty care. *Biomark Med.* 2010; 4: 465–73.
183. Chromy BA, Eldridge A, Forsberg JA, Brown TS, Kirkup BC, Jaing C, et al. Wound outcome in combat injuries is associated with a unique set of protein biomarkers. *J Transl Med.* 2013; 11: 281.
184. Hahm G., Eldridge A., Forsberg JA., Brown TS., Kirkup BC., Elster E., et al. Proteomic sample preparation for blast wound characterization. *Proteome Sci.* 2014; 12: 10.
185. Hyland EJ., D'Cruz R., Menon S., Chan Q., Lawrence T., La Hei E., Holland AJ. Prospective, randomised controlled trial comparing Versaje hydrosurgery and conventional debridement of partial thickness paediatric burns. *Burns.* 2015 Jun; 41(4): 700-7.
186. Mirastschijski U., Sander J.T., Zier U., Rennekampff H.O., Weyand B., Vogt P.M. The cost of post-burn scarring. *Ann Burns Fire Disasters.* 2015; 28(3): 215–222.
187. 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.*

188. Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 817-24.
189. Jin Y, Ling PX, He YL, Zhang TM. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. *Burns* 2007; 33: 1027-31.
190. Dai T, Tanaka M, Huang YY. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 857-79.
191. Travis TE, Mauskar NA, Mino MJ, Prindeze N, et al. Commercially available topical platelet-derived growth factor as a novel agent to accelerate burn-related wound healing. *J Burn Care Res* 2014; 35: 321-9.
192. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PloS One* 2014; 9: 88348.
193. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis R., Kviklys D., Uselis N., Janulis V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *Sci. World J.* 2014; 306217.
194. Bahramsoltani R., Farzaei M.H., Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. *Arch. Dermatol. Res.* 2014; 306: 601–617.
195. Hawksworth JS, Stojadinovic A, Gage FA, Tadaki DK, Perdue PW, Forsberg J, et al. Inflammatory biomarkers in combat wound healing. *Ann Surg.* 2009; 250:1002–7.
196. Hahm G, Glaser JJ, Elster EA. Biomarkers to predict wound healing: the future of complex war wound management. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127: 21–65.
197. Forsberg JA, Potter BK, Polfer EM, Safford SD, Elster EA. Do inflammatory markers portend heterotopic ossification and wound failure in combat wounds? *Clin Orthop Relat Res.* 2014 Sep;472(9):2845-54. doi: 10.1007/s11999-014-3694-

198. Cornell CN Do inflammatory markers portend heterotopic ossification and wound failure in combat wounds? . Clin Orthop Relat Res. 2014 Sep;472(9):2855-6.
199. 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. – C. 8.
200. Vandenplas I. Management of Benign Esophageal Strictures in Children *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2017; 20(4): 211–215.
201. Nakajima Y., Nakano Y., Fuwano S. et al., “Effects of three types of Japanese honey on full-thickness wound in mice,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013; 11.
202. Neub A., Houdek P., Ohnemus U., Moll I., and Brandner J. M., “Biphasic regulation of AP-1 subunits during human epidermal wound healing,” *Journal of Investigative Dermatology*. 2007; 127 (10): 2453–2462.
203. Al-Waili N. S., Salom K., and Al-Ghamdi A. A., “Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice,” *TheScientificWorldJournal*. 2011; 11: 766–787.
204. Nayak B. S., Pinto Pereira L. M., “*Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006; 6, 41.
205. Rawat S., Gupta A. “Development and study of wound healing activity of an ayurvedic formulation,” *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 1 (1):. 26–28.
206. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. S., Brem H., Tomic-Canic M., “Growth factors and cytokines in wound healing,” *Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16 (5): 585–601.
207. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur surg res Eur chirurgische Forschung Recherches chirurgicales eu*. 2012; 49: 35–43.

208. William A. Wells Zones and rings in wound healing. *J Cell Biol.* 2001 Aug 20; 154(4): 675.
209. Vijay MD; Devgan, Lara BA; Bhat, Satyanarayan PhD; Milner, Stephen M. The Pathogenesis of Burn Wound Conversion. *Annals of Plastic Surgery:* 2007; 59 (1): 109-115.
210. Tiwari VK. Burn wound: how it differs from other wounds? *Indian J Plast Surg.* 2012; 45: 364–73.
211. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453: 314–21.
212. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49: 35–43.
213. Daniel T1, Thobe BM, Chaudry IH, Choudhry MA, Hubbard WJ, Schwacha MG. Regulation of the postburn wound inflammatory response by gammadelta T-cells. *Shock.* 2007; 28(3): 278-83.
214. Глуткин А. В., Ковальчук В. И Термический ожог кожи у детей раннего возраста Монография. Гродно ГрГМУ 2016; 180.
215. Andre' Prauchner C. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns.* 2016; 09: 23
216. Yu J, Gao X, Chen X, Jin X, Zhang, Zhou X. Dynamics of monocyte surface receptors after burns: a pilot study. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2016 Jul-Sep; 30(3): 749-753.
217. Dipietro LA, Reintjes MG, Low QE, Levi B, Gamelli RL. Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1. *Wound Repair Regen.* 2001 Jan-Feb; 9(1): 28-33.
218. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 998–1008.
219. Karaman İ., Orhan Koç, Ayşe Karaman Evaluation of 968 children with corrosive substance ingestion. *Indian J Crit Care Med.* 2015; 19(12): 714–718.

220. Öztörün Cİ., Demir S. The outcomes of becoming a pediatric burn center in Turkey. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2016; 22(1): 34.
221. Zhou J., J.J. Tu, Y. Huangetal. Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2012; 28 (2): 111-115.
222. Paunel-Görgülü, A., T. Kirichevska, T. Lögters et al. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Mol. Med.* 2012; 18 (1): 325-335.
223. Полицарпова АВ, Перский ЕЭ. Сравнительное изучение динамики перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при ожогах различной природы. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія.* 2009; 878(10):40-7.
224. Регеда М.С., Кресюн, М. М. Регеда. Стан оксидантної й антиоксидантної систем у бронхах морських свинок за умов розвитку експериментальної пневмонії та корекція його порушень корвітином. *Одеський медичний журнал.* 2013; 1: 21-24.
225. Kaddoura I., L Kröger, K Nagel An activity-based and dynamic approach to calculate road traffic noise damages. *Transportation Research Part D: Transport and Environment.* 2015; 54: 335-347
226. Colton B. Nielson, Nicholas C. Duethman, James M. Howard, Michael Moncure, John G. Wood. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. *Journal of Burn Care & Research.* 2017; 38: 469–481.
227. Christopher Auger, Osai Samadi, Marc G. The biochemical alterations underlying post-burn hypermetabolism. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2017; 1: 2633–2644.
228. Нетюхайло Л. Г., С. В. Харченко Активні форми кисню (огляд літератури). *Молодий вчений.* 2014; 9: 131-135.

229. Kaddoura I1, Abu-Sittah G1, Ibrahim A1, Karamanoukian R2, Papazian N1. Burn injury: review of pathophysiology and therapeutic modalities in major burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2017; 30(2): 95-102.
230. Петренко О. М., Б. Г. Безродний, А. О. Тихомиров. Моніторинг перебігу ранового процесу гнійних ранах. *Хірургія України*. 2014; 2: 65-69.
231. Трохимович А. А., А. А. Кишко, Я. І. Сливка, О. Т. Ганич. Вільнорадикальне окислення і антиоксидантна система в серцево-судинній патології. *Науковий вісник Ужгородського університету. Сер. : Медицина*. 2011; 2: 361-364.
232. Чернякова Г. М., В. В. Мінухін, Є. П. Воронін. Сучасний погляд на місцеве лікування опіків з інфекційною складовою. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016; 4(1): 68-72.
233. Веремеенко К. Н., Д. И. Заболотный, А. И. Кизим. Роль протеолиза в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей (Обзор литературы и собственных исследований). *Журн. АМН Украины*. 2002; 8, № 2: 217–237.
234. Климашевич А.В., Никольский В.И., Богонина О.В., Акимов А.А., Шабров А.В. Способ прогнозирования рубцовых стриктур пищевода после химических ожогов. *Фундаментальные исследования*. 2013; 2 (1): 79-82.
235. Воскресенская М., Плеханов А. Результаты лечения химических ожогов и постожоговых рубцовых стриктур пищевода (обзор литературы). *Acta Biomedica Scientifica* 2015; 5 (105): 107-112.
236. Sarrazy V1, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmoulière A. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen*. 2011; 19 (1): 10-5.
237. Ганусевич І. І., Л. Д. Гуменюк, Д. С. Осинський, А. В. Ковельська, Л. М. Бубновська, Л. А. Мамонтова, С. П. Осинський. Зв'язок матриксних металопротеїназ-2 та -9 із регіонарним і віддаленим метастазуванням раку шлунка людини. *Онкологія*. 2014; 16, № 1: 40-46.

238. 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. 732.
239. 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
240. Лазаренко І. А., Н. М. Мельникова. Характеристика білкового складу крові щурів, отруєних свинцем. *Біологія тварин*. 2012; 14 (1): 316-320.
241. Нетюхайло Л. Г., С. В. Харченко, А. Г. Костенко. Патогенез опікової хвороби (частина II). *Світ медицини та біології*. 2011; 1: 131-135.
242. Яковлев В.Н., Савилов П.Н., Булгакова Я.В. Метаболизм глутамата в структурах головного мозга при экспериментальном геморрагическом шоке. *Общая реаниматология*. 2017;13(1):6-16.
243. Harpel PC, Gordon BR, Parker TS. Plasmin catalyzes binding of lipoprotein (a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(10): 3847–3851.
244. Wu, A., Yang, H., Lin, C. et al. *Cell Biochem Biophys* (2015) 72: 653. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0432-4>
245. Васильев В.И., Сокол Е.В., Родионова Е.Б., Пальшина С.Г., Александрова Е.Н., Раденска-лоповок С.Г., Пробатова Н.А., Кокосадзе Н.В., Ковригина А.М., Сафонова Т.Н., Боровская А.Б., Гайдук И.В. Связанные с IgG-4 поражения слюнных желез. *Терапевтический архив*. 2015; 87(8): 92-102.
246. Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Яковлев В.П. Антибактериальная терапия в комплексном лечении и профилактике инфекционных осложнений при ожогах. *«РМЖ»*. 1997; 24: 6-10.

247. Baugé C, Girard N, Lhuissier E, Boumediene K. Regulation and Role of TGF $\beta$  Signaling Pathway in Aging and Osteoarthritis Joints. *Aging Dis.* 2013; 5(6): 394-405.
248. Marta Ferrer. Predicting Chronic Spontaneous Urticaria Symptom Return After Omalizumab Treatment Discontinuation: Exploratory Analysis,. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice.* 2018; 6: 1191-1197.
249. Zinchuk VV1, Zhadko DD1, Gulyai IE. Prooxidant-antioxidant balance depending on endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism. *Biomed Khim.* 2018 Aug; 64(4): 349-353.
250. Гололобов В.Г. Скелетные ткани. Посттравматическая регенерация. Руководство по гистологии. СПб.: СпецЛит. 2001; 1:328 - 336.
251. Данилов Р.К. Учение о гистогенезе и регенерации тканей: современное состояние и перспективы развития. Морфологические основы гистогенеза и регенерации тканей.- СПб.: ВМедА. 2001; 1: 3-4.
252. Данилов Р.К., Боровая Т.Г., Ключков Н.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX в. И перспективы дальнейших исследований)
253. Бумейстер В.И., Погорелов М.В. Сучасний погляд на репаративний остеогенез. *Мир медицини и биологии.* 2008; 4: 104-110.
254. Регеда М.С., Запалення – типовий патологічний процес – Львів, 2005. – 53 с.
255. Зайко М.Н., Биць Ю.В. Патологічна фізіологія: Підручник. – К.: Вища школа. 1995; 615.
256. Резніков О. Г., Соловйов А. І., Добреля Н. В., Стефанов О. В.. Біоетична експертиза до клінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах. 2006; 28.
257. Раєцька Я. Б., Іщук Т. В., Савчук О. М. Експериментальна модель лужного опіку I та II-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів.

- Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2014; 1: 39 – 44.
258. Raetska Ya, Ischuk T, Koval T, Dzhus O, Savchuk O. Experimental modeling of an acid esophagus of 2nd degree in immature rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Problems of Physiological Functions Regulation*. 2015; 19(2): 15-8.
259. Ванцян ЭН, Тоцаков РА. Лечение ожогов и рубцовых сужений пищевода. М: Медицина. 1971; 260.
260. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. ГЭОТАР-Медиа. 2010; 971.
261. Медведев В.В. Клиническая лабораторная диагностика. Справочник, Издательство:Гиппократ. 2007; 360.
262. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 7: 248–54.
263. 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.
264. Збірник методичних рекомендацій з використання тест наборів фірми виробника «Human». [http://www.human.de/en/productNew/Clinical\\_Chemistry/Reagents\\_and\\_Consumables/Multipurpose\\_Reagents.php](http://www.human.de/en/productNew/Clinical_Chemistry/Reagents_and_Consumables/Multipurpose_Reagents.php)
265. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. ГЭОТАР-Медиа, 2010; 971.
266. Збірник методичних рекомендацій з використання тест наборів фірми виробника «Human». [Internet]. [cited 2018 Feb 6]. Available from: [www.human.de/en/productNew/Clinical\\_Chemistry/Reagents\\_and\\_Consumables/Multipurpose\\_Reagents.php](http://www.human.de/en/productNew/Clinical_Chemistry/Reagents_and_Consumables/Multipurpose_Reagents.php)

267. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М: Мир. 1969; 647.
268. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. Лабораторное дело. 1988; 2: 60-63.
269. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М: Медицина, 1977; 62-68.
270. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лабораторное дело. 1985; 11: 678-681.
271. Королюк М.А. Метод визначення каталазної активності в біологічному матеріалі. Лабораторна справа. 1988; 31-34.
272. Чиркин АА, редактор. Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: Виш шк. 2013; 491.
273. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 1976; 74(1): 214-26.
274. Разыграев АВ. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты). Клинико-лабораторный консилиум. 2004; 4: 19-22.
275. Власова СН, Шабунина ЕИ, Перслегина ИА. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. дело. 1990; 8: 19– 22.
276. Передерий ВГ, Земсков АМ, Бычкова НГ. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунологических нарушений. Киев: Здоров'я. 1995; 211.
277. Salter M. Richard G. Knowles, Salvador Moncada. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases. FEBS Letters. 1991; 291, № 1: 145–149.

278. So Chin Y, Kailash N. Pandey, Jin Shi S. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 1999; 277, № 5: 797–804.
279. Boyde T.R. Mohammed Rahmatullah. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Analytical Biochemistry*. 1980; 107 (2): 424–431.
280. Huse H., H. Böhme, G. Purification of antibodies by affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2002; 3: 217–231.
281. Harlow E. *Antibodies*, E. Harlow. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988; 726.
282. Карбовский В. Л., О. М. Савчук, Г. Л. Волков. Характеристика інгібітора агрегації тромбоцитів з отрути щитомордника далекосхідного (*Agkistrodon blomhoffii ussuriensis*). *Укр. біохім. журн.* 2006; 78, №3: 130–135.
283. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970; 227: 680–685.
284. Савчук О. М. Вивчення білок-білкових взаємодій у системі гемостазу з використанням методу ензим-електрофорезу. *Медична хімія*. 2010; 12, №1: 60–67.
285. Magdeldin S., Moser A. *Affinity Chromatography. Principles and Applications*. Amersham Pharmacia Biotech AB. 2012; 26.
286. Hummel B. C. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1956; 37: 1393–1995.
287. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. Унифицированный метод определения активности  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. *Вопросы мед. химии*. 1979; 4: 494–499.
288. Габриэлян НИ, Левицкий ЭР, Дмитриев ФФ. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических гидкостях. Москва: Медицина. 1985; 35.

289. Crowther J. R. The ELISA Guidebook. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001; 436.
290. Kirk CJ, Powell SR, Miller EJ. Assessment of cytokine-modulated proteasome activity. *Methods in Molecular Biology*. 2014; 1172: 147– 62.
291. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987; 162 (1): 156-159.
292. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений. Москва: Мир, 1975; 312.
293. Хатмуллин ИФ, Нигматуллин РТ. Реактивные изменения эпителия пищевода при экспериментальном химическом ожоге на фоне применения инъекционных форм биоматериалов аллаплант. *Регенеративная хирургия*. 2005; 1: 1123.
294. Aleksandrova AV. Assessment of influence of synthetic matrix metalloproteinases inhibitor doxycycline on the total proteolytic activity of blood in experimental thermal burns in rats. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2018; 1(78): 4–8.
295. Фисталь ЭЯ, Козинец ГГ, Самойленко ГЕ. Комбустиология. Донецк: ДонНМУ им. Горького. 2005. 271 с.
296. Iuonut A, Dindelegan G, Ciuce C. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2013; 8:438–47.
297. Петренко ОМ, Тихомиров ОА. Роль матриксних металопротеїназ у фізіологічних процесах загоєння ран. *Медична та клінічна хімія*. 2013; 4: 100–6.
298. Рыжакова О.С, Гуреева ТА, Агеев АН, Мошетьова ЛК, Яровая ГА, и др.. Коллагенолитическая и трипсиноподобная активности слёзной жидкости больных с ожоговой травмой глаза. *Офтальмологические ведомости*. 2012; 5(1): 75-84.

299. Staszczak M. Ubiquitin-proteasome pathway as a target for therapeutic strategies. *Postepy Biochem.* 2017; 63(4):287-303.
300. Климашевич АВ, Никольский ВИ, Богонина ОВ, Акимов АА, Шабров АВ. Способ прогнозирования рубцовых стриктур пищевода после химических ожогов. *Фундаментальные исследования.* 2013; 2: 79-82.
301. Amato B, Coretti G, Compagna R, Amato M, Buffone G, Gigliotti D, et al. Role of matrix metalloproteinases in non-healing venous ulcers. *International Wound Journal* 2015; 12(6): 641-5.
302. Amato B, Coretti G, Compagna R, Amato M, Buffone G, Gigliotti D, et al. Role of matrix metalloproteinases in non-healing venous ulcers. *International Wound Journal* 2015; 12(6): 641-5.
303. Jeong S, Schultz GS, Gibson DJ. Testing the influence of surfactant-based wound dressings on proteinase activity. *International Wound Journal* 2017; 14(5): 786-9
304. Ішук 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.
305. Раєцька Я.Б., Ішук, 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
306. Souček B, Pavelková E. *Pracovní lékařství.* Vylučování kyseliny trichloroctové. Roč. 1953; 5(2): 62-8.
307. Pan Y, Wei X, Hao W, Trichloroethylene and Its Oxidative Metabolites Enhance the Activated State and Th1 Cytokine Gene Expression in Jurkat Cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2015 Aug 28; 12(9):10575-86.
308. Kantarcioglu M, Caliskan B, Demirci H, Karacalioglu O. The Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Caustic Esophagus Injury: An Experimental Study. *Stem Cells International.* 2014; 1: 112.

309. Коваль ТВ, Рослова НМ, Раєцька ЯБ. Біохімічні та загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу II ступеня. Вісник Львівського університету. Серія:Біологічна. 2016; 73: 298-302.
310. Gökakın AK, Atabey M, Deveci K, Sancakdar E. The effects of sildenafil in liver and kidney injury in a rat model of severe scald burn: a biochemical and histopathological study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2014 Sep; 20(5): 319-27.
311. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А. Устойчивость к УФ излучению микроорганизмов, изолированных из наскальных биотопов Антарктики. *Мікробіологічний журн.* 2010; 72, № 3: 8–14.
312. Rassa S. A. Spaccamiglio, P. Esculapio, G. Abbadessa, L. Cangemi, F. DiCarlo, et al. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(4): 894-900.
313. Raetska YA.B, Chornenka N. M., , Savchuk O. M., Torgalo E.O., Beregova T. V., Ostapchenko L.I. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. *RJPBCS.* 2016; 7(5): 1042.
314. Голишкін Д. В., Фалалєєва Т. М., Чижанська Н. В., Берегова Т. В., Остапченко Л. І. Особливості лейкоцитарної формули крові щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразакових уражень шлунка та профілактичного введення меланіну. *Український антарктичний журнал.* 2015; 14: 114.
315. Gokakin A. K., K. Deveci, A. Kurt, BC. Karakus, C. Duger. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. *Burns.* 2013; 39: 1193.
316. Чорненька Н., Раєцька Я., Савчук О., Остапченко Л. Біохімічні зміни в сироватці крові щурів за умов експериментальної опікової хвороби та їх корекція меланіном. *Проблеми регуляції фізіологічних функцій.* 2016; 2(21): 44-49.

317. Yi Songa, Rui Zengb, Lingli Hua, Katherine G. In vivo wound healing and in vitro antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 93: 451–461.
318. Akymyshyn, M.M., Kuz'mina, N.V., Sachko, R.G. Aktyvnist' enzymiv antyoksydantnogo zahystu v reproduktyvnyh organah koriv za normy ta patologii'. *Nauk. visnyk LNUVMBT im. S.Z. G'zhyc'kogo*. L'viv. 2014; 2(59): 3–9.
319. Lavryshyn Y., Varkholyak I.S. The biological significance of the antioxidant defense system of animals body Y *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*. 2016; 2 (66): 18.
320. Netyukhailo L.G., Sukhomlin T.A., Basarab Ya.A., Bondarenko V.V., Kharchenko S.V. The state of the antioxidant system of the internal organs in rats during burn disease. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2014; 13(3): 51–56.
321. 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 Шевченко. Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2015; 19 2(19): 15-19..
322. Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci*. 2007; 12:29–36.
323. Parihar A1, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*. 2008 Feb;34(1):6-17.
324. Paunel-Görgülü, A., T. Kirichevska, T. Lögters et al. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Mol. Med*. 2012; 18 (1): 325-335.
325. Zhou J., J.J. Tu, Y. Huangetal. Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2012; 28 (2): 111-115.
326. Zmushko EI, Belozarov ES, Mitin Yu *Clinical immunology. Guidelines for doctors*. 2001; 574.

327. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS*. 1995; 103 (3): 161-179.
328. Kovalenko O. M., Mahltsev D. V., Kazmirchuk V. E., Kovalenko A. O. Studying of the cytokines dynamics in the injured persons in severe burns for estimation of a state severity and prognosis. *Clinical Surgery*. 2014; 2.
329. Pileri D., Accardo Palombo A., D'Amelio et al. L. Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome. *Ann. BurnsFireDisasters*. 2008; 21 (4): 182-185.
330. Polikarpov AV., Persky E. E. Comparative study of the dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels in skin burns *razlichnoy prirody* Bulletin of the University of Kharkiv. Series: Biology. 2011; 971 (14):27-32.
331. Wigenstama E., Elfsmarka L., Buchtab A., Jonasson S. Inhaled sulfur dioxide causes pulmonary and systemic inflammation leading to fibrotic respiratory disease in a rat model of chemical-induced lung injury *Author linksopenoverlay panel*, *Toxicology*. 2016; 368: 28-36.
332. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008 Jan; 214(2):149-60.
333. Pileri, D. A. Accardo Palombo, L. D'Amelio et al. Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome *Ann. BurnsFireDisasters*. 2008; 21 (4): 182-185.
334. 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.
335. Messingham, K.A.; Heinrich, S.A.; Kovacs, E.J. Estrogen restores cellular immunity in injured male mice via suppression of interleukin-6 production. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 70: 887–895.

336. Agay, D. M. Andriollo-Sanchez, R. Claeyssetal. Interleukin-6, TNF-alpha and interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely burned rats. *Eur. CytokineNetw.* 2008; 19 (1): 1-7.
337. Lyons, A., Kelly J.L., Rodricketal M.L. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann. Surg.* 1997; 226 (4):450-458.
338. Napolitano, L.M., Campbell C. Nitric oxide inhibition normalizes splenocyte interleukin-10 synthesis in murine thermal injury. *Arch. Surg.* 1994; 129 (12): 1276-1282.
339. Zhou H, Tu J, Huangetal Y. Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2012; 28(2): 111-5.
340. 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..
341. Алиева ТР. Определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов, уровней иммуноглобулинов классов Е и G и гистамина в крови и лимфе при анафилактическом шоке и феномене Артюса в эксперименте. *Казанский медицинский журнал.* 2018;99(1): 59-63.
342. Koval T, Ischuk T, Raetska Ya. Characteristics of immune response under experimental models of acid burns of the esophagus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Biology.* 2016; 72(2):52-5.
343. Ishchuk T.V., Rayetska 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.
344. Medrano-Campillo P, Sarmiento-Soto H, Álvarez-Sánchez N. Evaluation of the immunomodulatory effect of melatonin on the T-cell response in peripheral

- blood from systemic lupus erythematosus patients. *J Pineal Res.* 2015; 58(2):219-26.
345. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507: 366-70.
346. Yi Songa, Rui Zengb, Lingli Hua, Katherine G. In vivo wound healing and in vitro antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017; 93: 451–461.
347. Akymyshyn, M.M., Kuz'mina, N.V., Sachko, R.G. Aktyvnist' enzymiv antyoksydantnogo zahystu v reproduktyvnyh organah koriv za normy ta patologii'. *Nauk. visnyk LNUVMBT im. S.Z. G'zhyc'kogo. L'viv.* 2014; 2(59): 3–9.
348. Lavryshyn Y., Varkholyak I.S. The biological significance of the antioxidant defense system of animals body Y *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj.* 2016; 2 (66): 18.
349. Latha B., Babu M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns.* 2001 Jun; 27(4): 309-17.
350. Netyukhailo L.G., Sukhomlin T.A., Basarab Ya.A., Bondarenko V.V., Kharchenko S.V. The state of the antioxidant system of the internal organs in rats during burn disease. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2014; 13 (3): 51–56.
351. Jutkiewicz-Sypniewska J., Zembroń-Lacny A., Puchała J., Szyszka K., Gajewski P. Oxidative stress in burnt children. *Advances in Medical Sciences.* 2006; 51:316-320.
352. Досвядчинська М. Р., Антоняк Г. Л. Пероксидне окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів у клітинах легень щурів за щодобового введення афлатоксину В1. *Біологія тварин.* 2012; 14(2): 108-112.
353. Михальчик ЕВ, Титкова СМ, Ануров МВ, Пеньков ЛЮ, Коркина ЛГ. Антиоксидантные ферменты кожи при экспериментальных ожогах. *Биомедицинская химия.* 2006; 52(6): 576-86.

354. Fei ZW, Young VR, Lu XM, Rhodes AB, Tompkins RG, Fischman AJ, et al. Burn injury differentially alters whole-blood and organ glutathione synthesis rates: An experimental model. *Burns and Trauma*. 2013;1(2): 87–94.
355. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(10):1208–46.
356. Калинина ЕВ, Чернов НН, Новичкова МД. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. фераза и глутаредоксин *Успехи биологической химии*. 2014; 54:299–348.
357. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(2):532-53.
358. Борзова ИВ, Арутюнов ВА, Козина ЛС, Рыжак ГА. Коррекция нарушений оксидативного метаболизма в коже мышечей различного возраста с помощью пептидно-биоантиоксидантного комплекса. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*, 2012; 22(141): 14-8.
359. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*. 2008; 34: 6–17.
360. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol*. 2014;122:211–52.
361. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. *Journal of Burn Care & Research*. 2017 Jan; 38(1): e469–e481.
362. Sahib A. S., Al-Jawad F. H., and Alkaisy A. A., Effect of antioxidants on the incidence of wound infection in burn patients. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2010; 23 (4): 199–205.

363. Rawlingson A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns*. 2003; 29 (7): 631–640.
364. Li Y., Zheng J., Bird IM., Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endothelium*. 2005 Jan-Apr;12(1-2):21-39.
365. Xu HL., Liu MD., Yuan XH., Liu CX. Suppression of cortical TRPM7 protein attenuates oxidative damage after traumatic brain injury via Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Neurochem Int*. 2018 Jan; 112: 197-205.
366. Eduardo D. Costa, Bruno A. Rezende, Steyner F. Cortes, Virginia S. Lemos, Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol*. 2016; 7: 206.
- Mees B., Wagner S., Ninci E., Tribulova S., Martin S. Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity Is Essential for Vasodilation During Blood Flow Recovery but not for Arteriogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007; 27: 1926–1933.
367. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 88: 1157-1161
368. Abo El-Noor MM, Elgazzar FM, Alshenawy HA. Role of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in estimation of skin burn age and vitality. *J Forensic Leg Med*. 2017 Nov; 52: 148-153.
369. Zeng-Yu Yao, Jian-Hua Qi. Comparison of Antioxidant Activities of Melanin Fractions from Chestnut Shell. *Molecules*. 2016; 21: 487.
370. Wang Y., Beekman J., Hew J., Jackson S., Issler-Fisher AC. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 123: 3-17.

371. Ishchuk TV, Savchuk AM., Rayetska YB, Vereshchaka VV, Ostapchenko LI. Proteinase functioning of mucous membrane of esophagus after chemical burn. *Physiological journal*. 2015; 5: 61-67.
372. Sarrazy V., Bill F., Micallef L. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen*. 2011; 1: 10–15.
373. Magali de Bruyna B., J. Vandoorena, Ugarte-Berzala E. The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2016; 3: 22-29.
374. Sarrazy V., Bill F., Micallef L. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen*. 2011; 1: 10–15.
375. Chornenka N., Valetska K., Rayetska Ya., Ostapchenko L. Correction of melanin proteolytic activity in the conditions of modeling alkali burns of the esophagus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation*. 2017; 22 (1): 51-58.
376. Aciksari K., Teoman Yanar H., Hepgul G. The Effect of Beta-Aminopropionitrile and Prednisolone on the Prevention of Fibrosis in Alkali Esophageal Burns: An Experimental Study. *Gastroenterology Research and Practice*. 2013; 12: 7-11.
377. Gordiienko Iu. A., Babets Y. V., Kulinich A. O. Activity of trypsin-like enzymes and gelatinases in rats with doxorubicin cardiomyopathy. *Ukrainian Biochemistry Journal*. 2014; 6: 139–146.
378. Trujillo Piso D. Y., Ribeiro A. P., Silva M. L. Effects of antiproteolytic agents on corneal epithelial viability and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activity in alkaliburned corneas of rats. *Veterinary Ophthalmology*. 2014; 17: 23–31.
379. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2013; 13: 159–175.

380. Neely A., Clendening C., Gardner J. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Rep Reg.* 1999; 7: 166–171.
381. Peled Z. M., Phelps E. D., Updike D. L. Matrix metalloproteinases and the ontogeny of scarless repair: the other side of the wound healing balance. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 3: 801–811.
382. Krejner A, Litwiniuk M, Grzela T. Matrix metalloproteinases in the wound microenvironment: therapeutic perspectives Dove Medical Press. 2016; 3: 29-39.
383. Yang Y., Wei D., Xia ZF. Clinical investigation in the expression of matrix metalloproteinase 2 mRNA in the hyperplastic scar in burn patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2005 Feb; 21(1): 43-5.
384. Voronkina I.V, Kokorin K.V, Chulikov O.V, Blinova M.I, Pinaev G.P. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 of wound and burn exudates and their effect on extracellular matrix proteins *Tsitologiya.* 2003; 45(1): 43-50.
385. Caley Matthew P., Martins Vera L.C., Edel A. O'Toole. Metalloproteinases and Wound Healing *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015 Apr 1; 4(4): 225–234.
386. Steffensen B., Häkkinen L., Larjava H. Events of Wound-Healing – Coordinated Interactions Among Matrix Metalloproteinases (MMPs), Integrins, and Extracellular Matrix Molecules. *Cromb.* 2001; 5: 373–378
387. Reif S. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Markers of Inflammation but Not of the Degree of Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Digestion.* 2005; 2: 124-128.
388. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, Ermak G, Grune T, Davies KJ. The immunoproteasome, the 20s proteasome and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J.* 2010 Dec 15; 432(3):585-94.
389. Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Hollenberg MD, Chandran V. Proteinases and their receptors in inflammatory arthritis: an overview. *Nat Rev Rheumatol.* 2018 Mar;14(3):170-80.

390. Nakamura Y, Yokoyama K, Igaki K, Tsuchimori N. Role of Malt1 protease activity in pathogenesis of inflammatory disorders mediated by FcγR signaling. *Int Immunopharmacol*. 2018 Mar;56:193-6.
391. Коваль ТВ, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ. Зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу за розвитку кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. *Вісник Київського національного університету*
392. Ishchuk TV, Koval TV, Savchuk OM, Raetska YaB, Ostapchenko LI. Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats. *International Journal of Health Sciences and Research*. 2016; 6(12):259-64.
393. Aleksandrova AV. Assessment of influence of synthetic matrix metalloproteinases inhibitor doxycycline on the total proteolytic activity of blood in experimental thermal burns in rats. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2018; 1(78): 4–8.
394. McCarthy C., Reeves E.P., McElvaney N.G. The Role of NeutrophilLs in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 4:13.
395. Cosio M.G., Bazzan E., Rigobello C. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Beyond the Protease/ Antiprotease Paradigm. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 4:12.
396. Baraldo S., Turato G., Lunardi F., Bazzan E., Schiavon M., Ferrarotti I., Molena B., Cazzuffi R., Damin M., Balestro E. Immune activation in a1-antitrypsin-deficiency emphysema: beyond the proteaseantiprotease paradigm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191: 402–409.
397. Pott G.B., Chan E.D., Dinarello C.A., Shapiro L. J. α1-Antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *Leukoc Biol*. 2009; 85: 886–895.
398. Lin V.K., Wang S.-Y., Boetticher N.C. Alpha(2) macroglobulin, a PSA binding protein, is expressed in human prostate stroma. *Prostat*. 2005; 63: 299–308.
399. Ahmed A. Rehman, Haseeb Ahsan, Fahim H. Khan. J. Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian. *Cell Physiol*. 2013; 228(8): 1665–1675.

400. Bergin D.A, Hurley K, McElvaney N.G, Reeves E.P. Alpha-1 antitrypsin: a potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. *Arch Immunol Ther Exp*. 2012; 60: 81–97.
401. Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM, Kompanets IV, Beregova TV, and Ostapchenko LI. Effect of different doses of melanin in the blood protein changes in rats under alkaline esophageal burns. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017; 8(1): 261-270.
402. Zarghi A., Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res*. 2011; 10(4): 655–683.
403. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem*. 2007; 42: 3-27.
404. Blain H., Jouzeau JY., Netter P., Jeandel C. Non-steroidal anti-inflammatory agents with selective inhibitory activity on cyclooxygenase-2. Interest and future prospects. *Rev Med Interne*. 2000 Nov; 21(11): 978-88.
405. Hellmann J., Tang Y., Zhang MJ., Hai T., Bhatnagar A., Srivastava S., Spite M. Atf3 negatively regulates Ptgs2/Cox2 expression during acute inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015 Jan-Mar; 116-117
406. Батаев Х.М. Лечение ожоговых и рубцовых стенозов глотки и шейного отдела пищевода у детей: Дис.канд. Мед. Наук. М 2001.
407. Kim J., Vaish V., Feng M., Field K., Chatzistamou I., Shim M. Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice. *Aging*. 2016 Oct; 8(10): 2392–2405.
408. Roh BH, Kim DH, Cho MK, Park YL, Whang KU. Expression of Heat Shock Protein 70 in Human Skin Cells as a Photoprotective Function after UV Exposure. *Ann Dermatol*. 2008 Dec;20(4):184-189.
409. Чаланова РИ, Коломийчук СГ, Байдан ЕИ, Мбарки М. Содержание АТФ и глюкозо-6- фосфата роговицы при моделированном щелочном ожоге и возможность его коррекции цитофлавином. *Офтальмологический журнал*. 2013; 5(454):78-82.

410. Yan XP, Zhang DX, Yan TT, Zhang Q, Jia JZ, Huang YS. Effects of change in the activity of vacuolar adenosine triphosphatase of myocardial lysosome on myocardial damage in rats after severe burn and its mechanism. *Chinese Journal of Burns*. 2017;33(5):295-300.
411. Lewis E.C. Expanding the clinical indications for  $\alpha$ 1-antitrypsin therapy. *Mol. Med*. 2012; 18: 957-970.
412. Krasnobryzha E.M, Savchuk O.N, Platonov T.N, Volkov G.L. Role of tissue plasminogen activator and its inhibitor in the functioning of hemostasis under normal and pathological. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2004; 76: 28
413. Bian F., Pelegriano F., Pflugfelder S. Desiccating Stress-Induced MMP Production and Activity Worsens Wound Healing in Alkali-Burned Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015; 56: 4908–4918.
414. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 1:123
415. Bruen K, Campbell C, Schooler W. Real-Time Monitoring of Keratin 5 Expression during Burn Reepithelialization. *Journal of Surgical Research*. 2004; 120: 12–20.
416. Weremijewicz A., Matuszczak E., Sankiewicz A., Tylicka M., Komarowska M., Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors. *Burns*. 2018 Jun; 44(4): 931-940.
417. Bondarenko V.V, Netyuhaylo L.G, Avetikov D.S., Average mass molecules in the tissues of the salivary glands in experimental burn disease. *Taurian Medical and Biology*. 2012; 3(1): 49-50
418. Nagy B., Szélig L., Rendeki S., Loibl C., Rézmán B., Lantos J., Bogár L Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *J Crit Care*. 2015 Feb; 30(1): 162-6.

## ДОДАТОК А

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Раєцька Я. Б., Іщук Т. В., Савчук О. М., Остапченко Л. І. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу І ступеня в щурів. Медична хімія. 2013; 15(4): 30-34.

2. Раєцька Я.Б., Іщук Т.В., Джус О.І., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Експериментальна модель лужного опіку І та ІІ-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2014; 6(1): 39 – 44.

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

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.

5. Раєцька Я.Б., Іщук Т.В., Коваль Т.В., Джус О.І., Савчук О.М. Експериментальне відтворення моделі кислотного опіку стравоходу ІІ-го ступеню. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015; 19 2(19): 15-19.

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

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.

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.

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.

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

13. Коваль Т.В., Іщук 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

14. Chornenka N., Valetska K., **Raetska 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.

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 *P. Vulgaris* Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2017; 1(22): 36-39.

16. Ішчук 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.

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.

18. Chornenka N.M., Raetska Y.B., Savchuk O.M., Torgalo E.O., Beregova T.V., Ostapchenko L.I. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5): 1042-1047.

19. Chornenka N.M., Raetska Y.B., 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.

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.

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.

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 .

23. Koval TV., Ishchuk TV., Grebinyk DM., **Raetska Ya B.**, Sokur OV., Savchuk OM., Ostapchenko LI. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn. *Biomedical Research*. 2018; 29 (16): 3169-3173.

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, Ішук 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. Ішук 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. Ішук 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., Ішук 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 опікового 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 I 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 Durrës, 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 молодь 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., **Raetska 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.*

## ДОДАТОК Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної  
(навчальної) роботи  
Вінницького національного медичного  
університету імені М.І. Пирогова  
д. мед. н, проф. Ю.Й. Гумінський



“ 3 ” 12 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** корекція процесів загоснення за хімічного опіку стравоходу та за умов введення меланіну.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біохімія ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13 асистент Расцька Яна Борисівна

**3. Джерело інформації:**

1. Raetska YB. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia./ Chornenka NM., Raetska YB., Savchuk OM., Torgalo EO., Beregova TV., Ostapchenko LI.// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5): 1042-1047.

2. Raetska Ya. B. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation./ Raetska Ya. B., Chornenka N. M., Koval T. V., Savchuk O. M., Beregova T. V., Ostapchenko L. I. // Biomedical Research and Therapy. 2017; 4(9): 1591-1606..

3. Raetska Ya. Protective antioxidant effect of melanin against chemical burn-induced esophageal injury / Chornenka N., Raetska Ya., Grebinyk D., Dranitsina A., Savchuk O., Beregova T., Ostapchenko L. // Biomedical Research and Therapy. 2018; 5(10): 2712-2718.

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова в 2018-2019 н.р.

**5. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Расцької Я.Б. у навчальному процесі поглиблюють знання студентів про антиоксидантні препарати, демонструє перспективність використання антиоксидантів з метою цитопротекції, що сприяє кращій підготовці студентів до тем «Засоби, що впливають на процеси обміну речовин», «Антиоксидантні засоби».

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакології,  
д. мед. н., професор

Н.І. Волощук



Проректор з наукової роботи  
Тернопільського національного медичного  
університету імені І.Я. Горбачевського  
д. біол. н., проф. Кліщ І.М.  
11 2019 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** корекція процесів загоєння за хімічного опіку стравоходу та за умов введення меланіну.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13 асистент Раєцька Яна Борисівна

**3. Джерело інформації:**

1. Raetska YB. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia./ Chornenka NM., **Raetska YB.**, Savchuk OM., Torgalo EO., Beregova TV., Ostapchenko LI.// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5): 1042-1047.

2. Raetska Ya. B. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation./ Raetska Ya. B., Chornenka N. M., Koval T. V., Savchuk O. M., Beregova T. V., Ostapchenko L. I. // Biomedical Research and Therapy. 2017; 4(9): 1591-1606..

3. Raetska Ya. Protective antioxidant effect of melanin against chemical burn-induced esophageal injury / Chornenka N., Raetska Ya., Grebinyk D., Dranitsina A., Savchuk O., Beregova T., Ostapchenko L. //Biomedical Research and Therapy. 2018; 5(10): 2712-2718.

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського в 2018-2019 н.р.

**5. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Раєцької Я.Б. у навчальному процесі поглиблюють знання студентів про антиоксидантні препарати, демонструє перспективність використання антиоксидантів з метою цитопротекції, що сприяє кращій підготовці студентів до тем «Засоби, що впливають на процеси обміну речовин» та «Нутріціологія», «Фармакологія. Антиоксидантні засоби».

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології з клінічною фармакологією ТДМУ імені І.Я. Горбачевського, протокол № 10 від 25. 11. 2019 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакології  
з клінічною фармакологією, д.мед.н., проф.

Олещук О.М.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Тернопільського національного медичного  
університету ім. І.Я. Горбачевського  
д. біол. н, проф. Кліщ І.М.



2019 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** корекція процесів загоєння за хімічного опіку стравоходу та за умов введення меланіну.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13 асистент Раєцька Яна Борисівна

**3. Джерело інформації:**

1. Raetska YB. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia./ Chornenka NM., **Raetska YB.**, Savchuk OM., Torgalo EO., Beregova TV., Ostapchenko LI.// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016; 7(5): 1042-1047.

2. Raetska Ya. B. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation./ Raetska Ya. B., Chornenka N. M., Koval T. V., Savchuk O. M., Beregova T. V., Ostapchenko L. I. // Biomedical Research and Therapy. 2017; 4(9): 1591-1606..

3. Raetska Ya. Protective antioxidant effect of melanin against chemical burn-induced esophageal injury / Chornenka N., Raetska Ya., Grebinyk D., Dranitsina A., Savchuk O., Beregova T., Ostapchenko L. // Biomedical Research and Therapy. 2018; 5(10): 2712-2718.

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармації навчально-наукового інституту післядипломної освіти Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського в 2018-2019 н.р.

**5. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Раєцької Я.Б. у навчальному процесі поглиблюють знання студентів про антиоксидантні препарати, демонструє перспективність використання антиоксидантів з метою цитопротекції, що сприяє кращій підготовці студентів до тем «Засоби, що впливають на процеси обміну речовин» та «Нутріціологія», «Фармакологія. Антиоксидантні засоби».

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач кафедри фармації  
ННЦ післядипломної освіти,  
д.б.н., професор

Фіра Л.С.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної та  
 інноваційної роботи Львівського національного  
 медичного університету ім. Данила Галицького  
 д. мед. н, проф. Гжегоцький М. Р.

“4” \_\_\_\_\_ 2019 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** роль протеолізу в біохімічних механізмах загоєння опіку стравоходу

**2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13 асистент Раєцька Яна Борисівна

**3. Джерела інформації:**

1. Raetska Ya.B., Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats./Ishchuk T.V., Koval T.V., Savchuk O.M., Raetska Ya.B, Ostapchenko L.I. //Int J Health Sci Res. 2016; 6(12): 259-264.

2. Раєцька Я.Б. Функціонування протеїназ в слизовій оболонці стравоходу після хімічних опіків стравоходу/ Ішук Т.В., Савчук О.М., Раєцька Я.Б., Верещака В.В., Остапченко Л.І.// Фізіол. журн. 2015; 61(5): 71-75.

3 Raetska Y.B. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn./Koval TV., Ishchuk TV., Grebinyk DM., Raetska Ya B., Sokur OV., Savchuk OM., Ostapchenko LI.Biomedical Research. 2018; 29 (16): 3169-3173.

**4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри біологічної хімії ЛНМУ ім. Данила Галицького у 2018-2019 навчальному році.

**5. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Раєцької Я.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль порушень у системі протеолізу та взаємопов'язаних біохімічних процесів, що супроводжують процеси загоєння тканин, за умов хімічного опіку стравоходу, що сприяє кращій підготовці з тем «Загальні закономірності метаболізму», «Ферменти. Механізм дії ферментів», «Біохімія тканин».

**6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:  
 д.б.н., професор

Завідувач кафедри біологічної хімії,  
 д. мед. н., професор

Фоменко І.С.

Склярів О.Я.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи  
Харківського національного медичного  
університету  
проф. В.В.М'ясоєдов

2019 р.

### АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.)** : роль протеолізу в біохімічних механізмах загоєння опіку стравоходу
2. **Ким і коли запропонований**: асистент Раєцька Яна Борисівна, кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, у вересні 2019 року.
3. **Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.)**
  1. Raetska Ya.B., Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats/ Ishchuk T.V., Koval T.V., Savchuk O.M., Raetska Ya.B, Ostapchenko L.I. //Int J Health Sci Res. 2016; 6(12): 259-264.
  2. Раєцька Я.Б. Функціонування протеїназ в слизовій оболонці стравоходу після хімічних опіків стравоходу/ Іщук Т.В., Савчук О.М., Раєцька Я.Б., Верещака В.В., Остапченко Л.І.// Фізіол. журн. 2015; 61(5): 71-75.
  - 3 Raetska Y.B. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn./Koval TV., Ishchuk TV., Grebinyk DM., Raetska Ya B., Sokur OV., Savchuk OM., Ostapchenko LI. Biomedical Research. 2018; 29 (16): 3169-3173.
4. **Де і коли впроваджено**: у науково-педагогічний процес кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету в 2018-2019 н.р.
5. **Результати впровадження методу за період з 2018 по 2019 рр.** Використання результатів наукових досліджень Раєцької Я.Б. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль порушень у системі протеолізу та взаємопов'язаних біохімічних процесів, що супроводжують процеси загоєння тканин, за умов хімічного опіку стравоходу.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3)** сприяння кращій підготовці студентів з тем «Загальні закономірності метаболізму», «Ферменти. Механізм дії ферментів», «Біохімія тканин».
7. **Зауваження та пропозиції**: не вносилися.

**Відповідальний за впровадження:**

Завідувач кафедри біологічної хімії,  
д. мед. н., професор

04.12.2019 р.

Наконечна О.А.