

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

КОВАЛЬ ТЕТЯНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК 616.329-001.37-053

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

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Кучмеровська Тамара Муратівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів

доктор медичних наук, професор
Непорада Каріне Степанівна,
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»,
завідувач кафедри біоорганічної та біологічної хімії

Захист відбудеться «29» жовтня 2018 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

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

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м.Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий «27» вересня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24



Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хімічні опіки стравоходу продовжують залишатися однією з найбільш актуальних і соціально важливих проблем дитячого травматизму [Fishman D. S., 2018; Rafeey M., 2016]. Діти через незрілість тканинних структур та у недостатній мірі сформованих захисних реакцій органів і систем наражаються на більшу небезпеку в порівнянні з дорослими. У постраждалих виникають порушення всіх видів обміну речовин, особливо окисно-відновних процесів та розвивається опікова хвороба з різноманітними клінічними проявами [Лужникова Е.А., 2012]. У патогенезі опікової хвороби велике значення мають порушення системної гемодинаміки і мікроциркуляції та виражені метаболічні зміни, для яких характерна катаболічна спрямованість і посилення протеолізу.

На сьогодні змінилися уявлення про етіологію, патогенез і лікування захворювань людини, що обумовлено появою нових методик, які дозволяють виявити ризики розвитку того чи іншого захворювання на доклінічному етапі. Провідним і найбільш перспективним напрямком в цьому відношенні є вивчення білкового (протеомного) спектру в тканинах. Дослідження з використанням протеомного аналізу хвороб стравоходу нечисленні, найбільш вивченими є гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ), стравохід Барретта і аденокарцинома стравоходу [Zhao J., 2007; Breton J., 2008; Calabrese C., 2011; Колесов С.А., 2014].

За опіку стравоходу провідну роль в деградації білків відіграють протеолітичні ферменти, які беруть участь у відторгненні пошкоджених тканинних елементів, у розвитку необоротних реакцій, утворенні біологічно активних речовин та забезпечують швидку відповідь клітини на дію подразників ендогенної та екзогенної природи [Маркушева Л.И., 1998; Доценко В. Л., 2000; Кондакова И.В., 2017]. Процеси протеолізу мають безпосереднє відношення до реакцій запалення та деструкції тканин [Агапова Ю.Р., 2012; Іліка В.В., 2018] і є необхідною умовою нормального перебігу регенерації [Портнова М.М., 2017]. У той же час надмірна активація протеолізу може бути причиною пошкодження нативних тканин і розширення вогнища запалення. Це особливо небезпечно для стравоходу, де посилення запального процесу може привести до істотного рубцевого звуження і навіть створити загрозу перфорації органу [Ормантаев К.С., 2016]. Пацієнти з хімічним опіком стравоходу мають достатньо високий ризик розвитку карциноми органу [Kochhar R., 2006; Noh S.Y., 2017].

Система протеолізу включає протеолітичні ферменти, їх неактивні форми, активатори та інгібітори протеїназ, продукти протеолізу [Дудченко Н.А., 1998]. Вивчення протеолітичної деградації білків має важливе значення для розуміння молекулярних механізмів патогенезу захворювання і виявлення нових терапевтичних мішеней. Пептиди, які утворюються в результаті деградації біополімерів, здійснюють виражену токсичну дію не лише на ушкоджений орган, але на весь організм в цілому [Сидельникова В.И., 2015]. Тому встановлення взаємозв'язку між тяжкістю клінічних проявів після опіку і ступенем підвищення вмісту в крові пептидів, як інтегративного показника інтоксикації, є актуальним для оцінки ефективності клінічної терапії хворих опіковою хворобою. Незважаючи на

існуючі дослідження, на сьогодні залишається недостатньо вивченим патогенез утворення рубців та розвитку запалення за хімічних опіків стравоходу.

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

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в НДЛ «Фізико-хімічної біології», відділення експериментальної біології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.).

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

Відповідно до мети було визначено наступні завдання:

1. Відтворити модель кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості у статевонезрілих щурів та визначити морфологічні, цитологічні та біохімічні параметри функціонування тканин за даної патології.
2. Оцінити вплив кислотного опіку стравоходу на перекисне окиснення ліпідів та систему антиоксидантного захисту.
3. Визначити співвідношення протеїназ та їх інгібіторів, оцінити білковий склад та вміст молекул середньої маси у сироватці крові та у слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості.
4. Визначити вміст шаперонів та активність протеасом у тканинах стравоходу в динаміці за експериментального кислотного опіку стравоходу.
5. Проаналізувати рівень циркулюючих імунних комплексів, вміст імуноглобулінів класу G та цитокінів у сироватці крові статевонезрілих щурів за умов кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості.

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

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

Методи дослідження: у роботі проводили спектрофотометричне визначення загальноклінічних та біохімічних показників крові, активності протеїназ та їх інгібіторів, вмісту молекул середньої маси (МСМ), активності ферментів про- та антиоксидантної системи, продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, концентрації білка; флуориметричне визначення активності

протеасом, вмісту окисненого та відновленого глутатіонів, вмісту шиффових основ; імуноферментний аналіз вмісту шаперонів Hsp60 та Hsp70, матриксних металопротеїназ (ММП), тканинного інгібітора металопротеїназ-1 (ТІМП-1), основного фактору росту фібробластів (bFGF), Ig G, про- та протизапальних цитокінів; метод преципітації для визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК); диск-електрофорез білків слизової оболонки стравоходу та сироватки крові; цитологічний аналіз клітин крові та гістологічне дослідження стравоходу; статистичний аналіз.

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

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

Вперше показано зниження вмісту шаперонів Hsp60 та Hsp70 та підвищення активності протеасом в стравоходах щурів після кислотного опіку. На 21 добу після травми хімотрипсинподібна активність 26s протеасом у 1,4 рази вище за контроль, а каспазоподібна – у 7 раз.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Експерименти проводили на нелінійних білих статевонезрілих щурах-самках масою 90-110 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до їжі та води. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій щодо проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з принципами біоетики, законодавчими нормами та вимогами «Європейської конвенції» (Страсбург, 1986). Кислотний опік стравоходу II ступеню тяжкості відтворювали шляхом введення за допомогою зонду 0,2 мл 30% трихлороцетової кислоти (CCl_3COOH). Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об’єм води для ін’єкцій. Тварин виводили з експерименту на 1, 7, 15 та 21 доби з моменту введення CCl_3COOH /вода [Фисталь Э.Я., 2005].

У роботі використовували гістологічні та цитологічні методи дослідження [Лили Р., 1969; Макаров В.Г., 2013]. Визначення біохімічних показників у сироватці крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 з використанням відповідних тест-наборів. Визначення вмісту білка проводили за методом Бредфорд [Bradford M.M., 1976].

Визначення вмісту шиффових основ та дієнових кон’югатів оцінювали спектро(флуоро)метрично в гептан-ізопропанольному екстракті [Гаврилов В.Б., 1988; Колесова О.Е., 1984]. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з

тіобарбітуровою кислотою [Стальная И., 1977]. Супероксиддисмутазну активність визначали за [Чеварі С., 1985]. Каталазну активність оцінювали за [Королюк М. А., 1988]. Вміст SH-груп визначали спектрофотометрично згідно з методом [Чиркин А.А., 2015].

Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначали флуориметричним способом з використанням ортофталевого альдегіда за методом [Hissin P., 1976]. Активність глутатіонзалежних ферментів визначали згідно з [Власова С.Н., 1990; Разыграев А., 2004].

Загальну активність протеїназ у зразках аналізували методом визначення казеїнолітичної активності з модифікаціями. Для селективного визначення активності металопропротеїназ та серинових протеїназ до реакційної суміші додавали до кінцевої концентрації 0,2М етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) або 0,2М фенілметилсульфоніл флуорид (ФМСФ), відповідно [Hummel B.C., 1959]. Визначення активності α 1-антитрипсину (α 1-АТ) та α 2-мактроглобуліну (α 2-МГ) проводили за методом [Нартикова В.Ф., 1979]. Активність α 1-АТ і α 2-МГ виражали в умовних одиницях інгібування (ІО) в 1мл сироватки крові.

Оцінку протеасомної активності проводили спектрофлуориметрично за методом [Kirk C. J., 2014]. Вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ТІМП-1, bFGF, Ig G, про- і протизапальних цитокінів та вміст шаперонів визначали методом імуноферментного аналізу [Crowther J. R., 2001].

Вміст ЦІК у сироватці крові визначали методом преципітації: високомолекулярних ЦІК – з використанням 3 % розчину поліетиленгліколю (ПЕГ), середньомолекулярних – 4,5 % ПЕГ, низькомолекулярних – 6 % розчину поліетиленгліколю–6000 (ПЕГ– 6000) [Передерий В. Г., 1995].

Кількісний та якісний склад білкових фракцій слизової оболонки стравоходу та сироватки крові щурів досліджували за допомогою методу диск-електрофорезу [Laemmli U.K., 1970]. Визначення вмісту МСМ проводили спектрофотометрично за методом [Габриэлян Н.И., 1985].

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи методи математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм Microsoft Excel 2017 та TotalLab 1.10. Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (М) і стандартної похибки середнього арифметичного (m).

Результати досліджень та їх обговорення

Метаболічні порушення за кислотного опіку стравоходу. Було відтворено модель КОС II ступеня тяжкості на статевонезрілих щурах. Для підтвердження моделі та виявлення метаболічних порушень було проведено ряд досліджень. Гістологічні дослідження продемонстрували ураження слизової оболонки стравоходу (епітелію, власної та м'язової пластинки) (рис.1). Було виявлено пошкодження поверхневих шарів епітелію, набряки, крововиливи. Опік стравоходу супроводжується тривалими порушеннями обміну вуглеводів, ліпідів та білків, що приводить до патологічних змін у функціонування різних органів та систем.

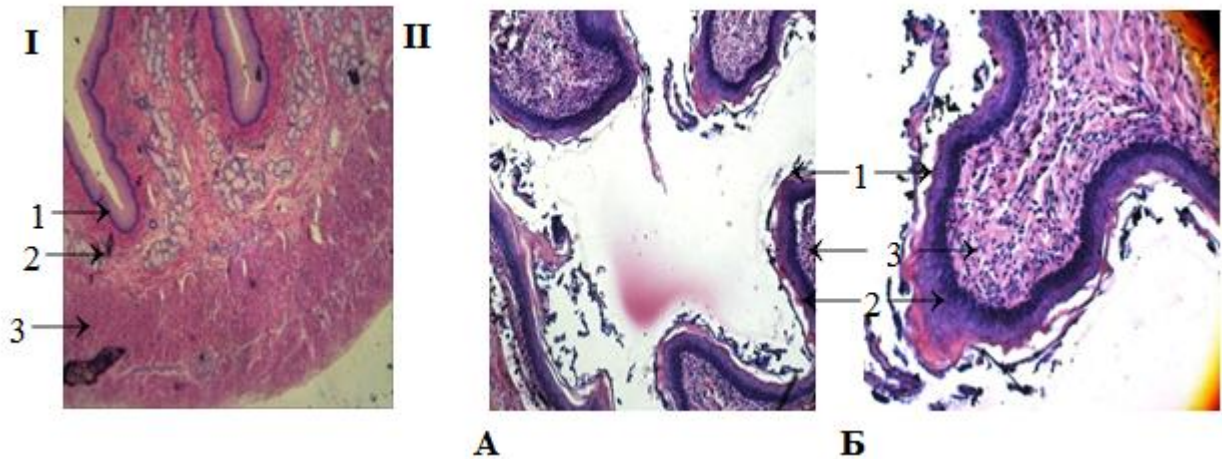


Рис. 1. Мікрофотографія стравоходу щурів: контроль (I) та за кислотного опіку (II: А- 1 доба, Б – 21 доба) Забарвлення гематоксиліном і еозином. X 200
1 – епітелій 2. - власна пластинка 3. - м'язова пластинка

За цитологічних досліджень клітин крові встановлено підвищення вмісту лейкоцитів на тлі зменшення числа еритроцитів (табл. 1). Лейкоцитоз свідчить про патологічні процеси, які протікають в організмі за опікової хвороби. Дослідження біохімічних показників показали зниження вмісту білка, яке відбувалось, головним чином, за рахунок зменшення кількості альбуміну. Також за даної патології ми спостерігали підвищення рівня сечовини, креатиніну, аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспаратамінотрансферази (АСТ) разом з порушенням водно-сольового обміну організму (табл. 2). Виявлені метаболічні порушення можуть свідчити про розлади кровообігу та порушення роботи печінки і нирок.

Проведені дослідження та отримані загальноклінічні та біохімічні параметри за КОС II ступеня тяжкості статевонезрілих щурів свідчать про метаболічні порушення, що відповідають клінічній картині, яка спостерігається за опіку стравоходу у дітей віком від 1 до 8-ми років [Терновский С.Д., 1963; Ванцян Э.Н., 1991].

Стан системи перекисного окиснення ліпідів та функціонування системи антиоксидантного захисту за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. Як відомо, процеси перекисного окиснення ліпідів належать до основних метаболічних реакцій, що відбуваються в клітині. Як діагностичний критерій тяжкості опікової хвороби ми визначали вміст продуктів ПОЛ та стан антиоксидантної системи (АОС). За опіку основним внутрішнім джерелом небезпеки для клітинного гомеостазу є продукти, утворені в результаті метаболізму кисню. За кислотного опіку стравоходу відбувалось накопичення продуктів ПОЛ, зниження активності супероксиддисмутази та каталази, виражене і тривале зниження вмісту білкових сульфгідрильних груп (табл. 3), зниження вмісту відновленого глутатіону на тлі підвищення окисненої форми глутатіону та інгібування всіх ферментів глутатіонової системи (рис. 2).

Таблиця 1

Загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за кислотного опіку стравоходу (M±m, n=10)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Гемоглобін (Hb) (г/л)	148 ±1,32	155±0,03	178±0,01*	151,2±0,03	133±1,19*
Еритроцити (ER) (*106/мм3)	7,12±0,11	5,1±0,05*	5,9±0,07*	5,6±0,06*	5,4±0,06*
Лейкоцити (WBC)(*103/мм3)	1,47±0,12	5,12±0,05*	3,8±0,02*	6,2±0,07*	7,1±0,09*
Лімфоцити (%)	32,15±1,45	62,6±2,7*	31,5±1,4	59,4±2,6*	59,67±2,6*
Моноцити (МО) (%)	3,5±0,70	6,7±0,93*	13±0,65*	7,1±0,93*	6±0,084*
Паличкаядерні нейтрофіли(%)	2±0,35	1,7±0,42	1,5±0,29	1,5±0,29	4±0,41*
Сегментоядерні нейтрлофіли (%)	60,2±1,29	28±1,04*	54±1,20	31±1,11*	29±1,10*

* – p<0,05 порівняно з контролем

Таблиця 2

Біохімічні параметри сироватки крові статевонезрілих щурів за кислотного опіку стравоходу, (M±m, n=8)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Загальний білок (мг/мл)	64,8±3,11	48,6±2,33*	48,2±2,31*	51,8±2,49*	50,4±2,42*
Альбумін (мг/л)	36,5±0,01	16,0±1,36*	21,2±2,01*	25,3±1,91*	25,5±1,01*
Сечовина (ммоль/л)	8,90±0,11	19,3±2,01*	16,7±2,01*	14,1±1,23*	13,3±0,53*
Креатинін (мкмоль/л)	88,9±0,11	151±1,41*	146±1,31*	134±0,81*	91,7± 0,12
K+ (ммоль/л)	5,51±0,11	8,51±0,16*	8,20±0,15*	6,40±0,13*	6,10±0,13*
Na+ (ммоль/л)	156±2,61	147±1,89*	144±1,78*	149±1,91	151±2,12
Ca ²⁺ (ммоль/л)	10,6±0,21	5,80±0,11*	10,7±0,20	8,90±0,16*	9,50±0,18
Mg ²⁺ (ммоль/л)	2,86±0,05	1,65±0,03*	3,40±0,05	3,30±0,05	2,10±0,05
Cl ⁻ (ммоль/л)	110±2,51	105±1,99	95,6±1,57*	103±1,97	106±1,98
АЛТ (од/л)	27,7±0,55	80,9±1,62*	63,9±1,28*	59,1±1,18*	44,3±0,89*
АСТ (од/л)	55,5±1,11	74,2±1,48*	66,7±1,33*	60,3±1,21*	61,8±1,24*

* – p<0,05 порівняно з контролем

Зниження активності даних ферментів може стати важливим чинником ініціації процесів ліпопероксидації та посиленого окиснення білків, що, в свою чергу, може призвести до патологічних наслідків. Надмірна продукція активних форм кисню (АФК), що утворюється за опіку, пов'язана з такими порушеннями, як синдром системного опіку, імуносупресія, інфекція та сепсис, пошкодження тканин і множинна недостатність органів [Nielson C. B.; 2017].

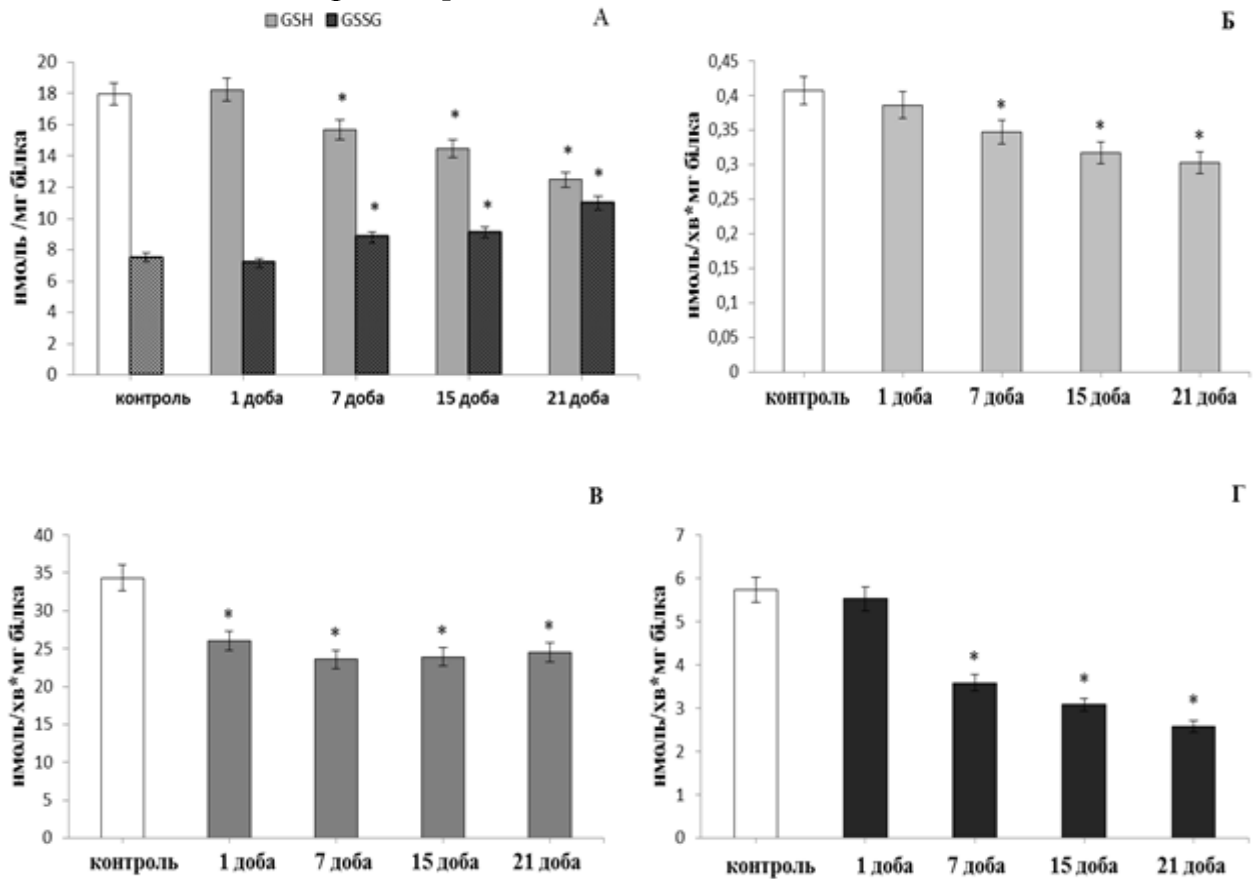


Рис.2. Вміст відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону (А), глутатіонредуктазна (Б), глутатіонпероксидазна (В) та глутатіонтрансферазна (Г) активність у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Отримані результати свідчать про суттєві метаболічні порушення на клітинному рівні, які обумовлені процесами надмірної продукції активних форм кисню та є умовою для активації посиленого протеолізу.

Дослідження системи протеолізу за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. При визначенні загальної протеолітичної активності, активності металопротеїназ та серинових протеїназ в плазмі крові максимальне значення показників спостерігали на 7 добу після опіку (рис.3). Так, загальна протеолітична активність на 1 та 7 доби експерименту зростала у 1,4 та 2,9 рази відповідно, відносно контролю. Активність металопротеїназ на 1 добу після опіку

Таблиця 3

Вміст продуктів перекисного окиснення та SH-груп, супероксиддисмутаза та каталазна активності за умов кислотного опіку стравоходу, (M±m, n=8)

	контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
сироватка крові					
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	32,3±1,3	34,5±1,4	48,2±1,9*	50,9±2,3*	33,7±1,3
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	192±7,9	231±9,2*	339±13,6*	389±15,6*	342±13,7*
Шифові основи, ум.од./мл	20,1±0,8	20,6±0,8	21,1±0,8	21,4±0,9	25,1±1,1*
Супероксид-дисмутаза, ум. од./хв*мг	26,1±1,1	8,1±0,3*	6,1±0,3*	11,1±0,5*	19,1±1,1*
Каталаза, мкмоль/ хв*мг	7,06±0,3	4,15±0,2*	3,92±0,2*	4,44±0,2*	4,71±0,2*
SH-групи, мкмоль/мг	15±0,6	15±0,6	12±0,5*	11±0,4*	9±0,4*
слизова стравоходу					
Дієнові кон'югати, нмоль/мл	19,5±0,8	42,7±1,7*	38,6±1,6*	37,2±1,5*	20,2±0,8
ТБК-активні продукти, нмоль/мл	104±4,2	208±8,3*	265±10,6*	245±9,8*	235±9,4*
Шифові основи, ум.од./мл	22,2±0,9	23,6±0,9	25,4±1,1*	26,2±1,1*	27,2±1,1*
Супероксид-дисмутаза, ум. од./хв*мг	15,7±0,7	15,4±0,7	15,2±0,7	14,2±0,6*	10,2±0,5*
Каталаза, мкмоль/ хв*мг	3,66±0,2	2,68±0,1*	2,27±0,1*	2,97±0,1*	3,21±0,1*
SH-групи, мкмоль/мг	2,2±0,1*	1,7±0,1*	0,6±0,02*	0,3±0,01*	0,2±0,01*

*- p<0,05 порівняно з контролем

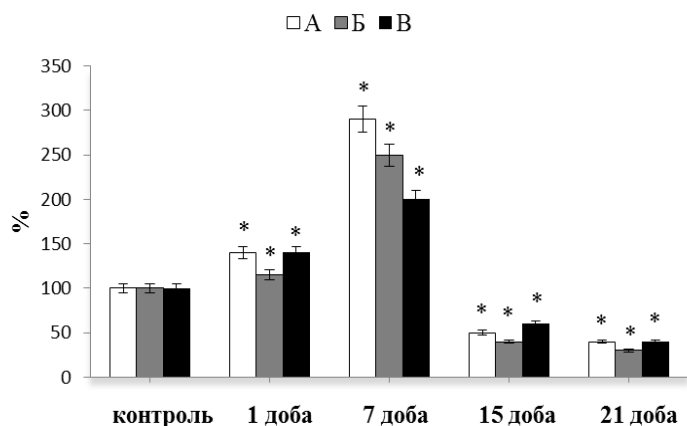


Рис.3. Загальна протеолітична активність (А), активність металопротеїназ (Б) та серинових протеїназ (В) у плазмі крові за КОС ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

була у 1,1 рази вище за контроль, а на 7 добу експерименту - у 2,5 рази. Активність серинових протеїназ підвищувалася на 1 та 7 доби у 1,4 та 2 рази відповідно. У наступні терміни часу загальна протеолітична активність та активність серинових протеїназ у 2 рази, металопротеїназ у 3,4 рази була нижча за контроль, що може свідчити про утворення комплексів з інгібіторами та елімінацію ферментів з кров'яного русла. Необхідно зазначити, що регенераційні процеси за опіку стравоходу починаються з 10-15 доби, тому зниження активності основних протеолітичних ферментів, які беруть участь у ремоделюванні може призвести до надмірного рубцювання опікової рани [Климашевич А.В., 2013].

Протеолітична деградація екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) є одним з ключових етапів загоєння опікових уражень. При дослідженні вмісту матриксних металопротеїназ (ММП), які відповідають за деградацію ЕЦМ, у слизовій оболонці стравоходу максимальне підвищення майже всіх досліджуваних ММП спостерігали на 21 добу після опіку (табл. 4).

Таблиця 4

**Вміст матриксних металопротеїназ за кислотного опіку стравоходу, (ум.од./мл)
 $M \pm m$, $n=8$**

	ММП-1	ММП-2	ММП-3	ММП-8	ММП-9
Сироватка крові					
контроль	0,104±0,004	0,105±0,004	0,079±0,003	0,055±0,002	0,045±0,002
1 доба	0,138±0,006*	0,192±0,008*	0,073±0,003	0,060±0,002	0,071±0,003*
7 доба	0,130±0,005*	0,148±0,006*	0,077±0,003	0,074±0,003*	0,067±0,003*
15 доба	0,120±0,005	0,190±0,008*	0,084±0,003	0,072±0,003*	0,077±0,003*
21 доба	0,110±0,004	0,141±0,006*	0,085±0,003	0,069±0,003*	0,075±0,003*
Слизова стравоходу					
контроль	0,145±0,006	0,128±0,005	0,113±0,005	0,085±0,003	0,110±0,004
1 доба	0,303±0,012*	0,281±0,011*	0,174±0,007*	0,128±0,005*	0,154±0,006*
7 доба	0,214±0,009*	0,192±0,008*	0,178±0,007*	0,109±0,005*	0,176±0,007*
15 доба	0,250±0,009*	0,288±0,012*	0,183±0,007*	0,111±0,005*	0,134±0,005*
21 доба	0,311±0,013*	0,265±0,011*	0,217±0,009*	0,150±0,006*	0,186±0,007*

*- $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

У середньому в даний термін часу показник був у 1,9 рази вище контрольних показників. Виключенням була ММП-2, вміст якої максимально підвищеним був на 15 добу після опіку, у 2,3 рази вище контролю. У сироватці крові максимальне підвищення ММП-1 та -2 спостерігали на 1 добу після опіку, у 1,3 та 1,8 рази, відповідно; ММП-8 та -9 - на 15 добу у 1,4 та 1,7 рази відповідно; а вміст ММП-3 достовірно не змінювався. Отримані результати можуть бути обумовлені змінами вмісту різних типів колагену, що є субстратом для вищевказаних ферментів, під час загоєння опікової рани.

Найбільш універсальним механізмом регуляції протеолізу є контроль, який здійснюють інгібітори протеїназ. Найбільш вивченими є α_1 -антитрипсин та α_2 -макроглобулін [Shah D., 2018].

Інгібіторна активність α_1 -антитрипсину була вище контрольного рівня протягом всього досліджуваного терміну (рис.4). Найвищого значення показник досягав на 7 добу, у 2,2 рази вище за контроль. Інгібіторна активність α_2 -макроглобуліну мала різнонаправлений характер, найвище значення показника спостерігали як на 7 та і на 21 добу, в середньому у 1,4 рази вище контрольних показників. Підвищення інгібіторної активності α_2 -макроглобуліну на 21 добу може свідчити про подальший розвиток запалення та інфекційних процесів у рані. Проте, з іншого боку – довготривалий процес запалення є однією з причин патологічних змін в органах та тканинах і може сприяти розвитку фіброзу тканин.

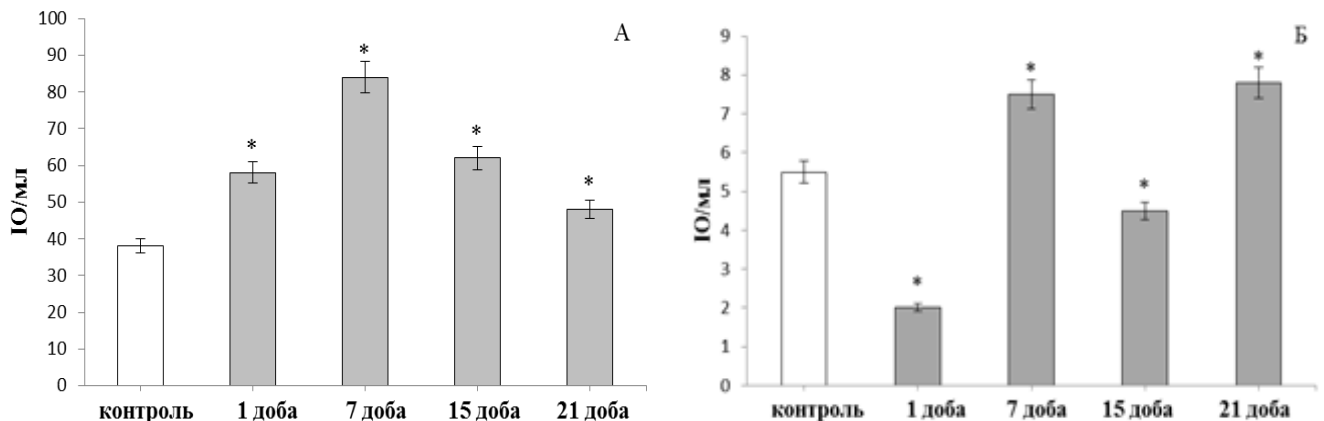


Рис.4. Активність α_1 -антитрипсину (А) та α_2 -макроглобуліну (Б) у сироватці крові статевонезрілих щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

*- $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Для запобігання надмірного розщеплення ЕЦМ існує декілька рівнів регуляторних механізмів контролю активності ММП. Так, в тканинах ММП можуть інгібуватися α_2 -макроглобуліном, який здатний зв'язуватись з цими ферментами [Nagase H., 1996]. Активність ММП також регулюється специфічними тканинними інгібіторами – ТІМП. ТІМП-1 є універсальним біомаркером ураження колагенового матриксу [Тепляков А.Т., 2014]. Вміст ТІМП-1 у слизовій оболонці стравоходу досягав максимального значення на 21 добу після опіку, показник був у 1,9 рази вище за контроль (рис.5). У сироватці крові рівень ТІМП-1 на 1 та 7 доби після опіку був нижче за контроль у середньому у 1,2 рази. На 15 та 21 доби даний

показник підвищувався до контрольного рівня. Отже, КОС викликає неконтрольовану протеїназну активність, яка є однією з головних причин ран, що не загоюються.

Основний фактор росту фібробластів (bFGF) володіє вираженою здатністю посилювати утворення сполучної тканини і судинних капілярів, а також приймає участь у регенерації тканин [Kaga T., 2012]. Нами показано зростання вмісту фактору росту фібробластів (bFGF) протягом експерименту, максимальне підвищення у 1,8 раз спостерігали на 21 добу (рис.5). Виключенням є 15 доба, у указаний термін вміст bFGF знижувався до контрольного, що корелює з рівнем MMP та TIMP в цей проміжок часу. Ангіогенез, опосередкований bFGF, відбувається шляхом активації c-Jun N-кінцевої кінази/стрес-активованої протеїнкінази. Інгибування bFGF призводить до зниження міграції фібробластів і затримки загоєння ран, в той час як застосування рекомбінантного bFGF прискорює загоєння ран [Tang Q.L., 2014].

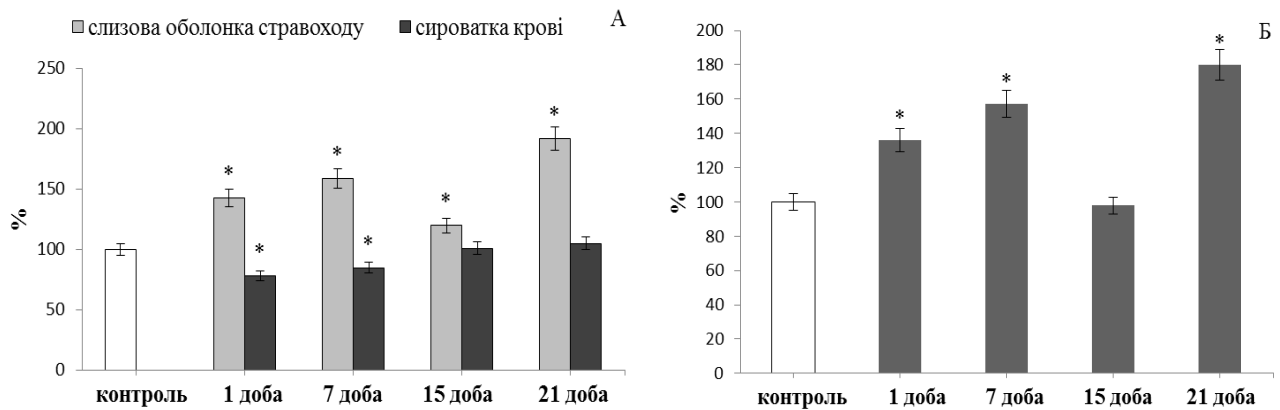


Рис.5. Відносний вміст тканинного інгібітора металопротеїнази 1(А) у слизовій оболонці стравоходу і сироватці крові та фактора росту фібробластів (Б) у слизовій оболонці стравоходу за КОС ($M \pm m$, $n=8$)

*- $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Протеоліз в цитоплазмі здійснюється складною багатокомпонентною системою, до складу якої входять протеасоми та шаперони. У еукаріот шаперони приймають участь у деградації білків, оскільки деградація деяких протеолітичних субстратів убіквітинової системи потребує присутності катіонів та молекулярних шаперонів [Яровая Г.А., 2003]. Вміст шаперону Hsp60 у слизовій оболонці стравоходу достовірно перевищив контроль у 1,1 рази лише на 21 добу після опіку (рис.6). Разом з тим, вміст Hsp70 був нижчий за контроль протягом всього досліджуваного періоду. І лише на 21 добу вміст Hsp70 наблизився до контрольних показників. Hsp60 є молекулярним шапероном, який бере участь у фолдінгу і збірці мітохондріальних білків та полегшує протеолітичну деградацію білків, що неправильно згорнулися або денатуровані. В той час як, Hsp70 переважно зв'язується з білками, які не згорнулися або частково згорнулися, і запобігає їх агрегації або неправильному фолдінгу. Також Hsp 60 та Hsp 70 є АТФ-залежними білками. Очевидно, що зниження їх рівня свідчить про зниження рівня АТФ за опікової хвороби, що узгоджується з даними літератури [Чаланова Р.И., 2013].

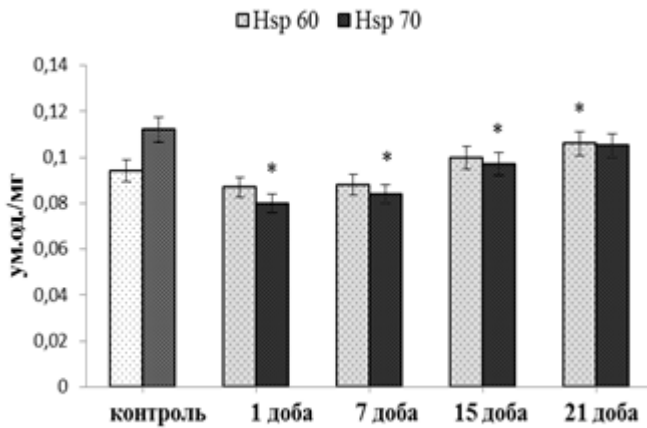


Рис. 6. Вміст шаперонів Hsp 60 та Hsp 70 у стравоході щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)
* $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Протеасома з коефіцієнтом седиментації 26s є мультисубодиничним білковим комплексом, яка складається з 20s каталітичної та 19s регуляторної частин [Евтеева И.Н., 2013]. Вони є первинними сайтами для деградації білка у клітинах ссавців. Ми досліджували хімотрипсинподібну (ХТП) та каспазоподібну (КП) активності протеасом у тканинах стравоходу щурів (табл. 5). ХТП активність протеасом (26s) на 1 добу після КОС знизилась у 2,9 рази відносно контролю. На 7, 15 та 21 доби після опіку ХТП активність була вище за контроль у 1,8, 2,3 та 1,4 рази відповідно. Подібна тенденція спостерігалась при дослідженні 20s ХТП активності. На 1 добу даний показник був нижче за контроль у 1,1 рази. На 7, 15 та 21 доби ХТП активність 20s була вище за контроль, у 3,3, 4,3 та 2,3 рази відповідно. КП активність протеасом, як 26s так і 20s, підвищувалась, починаючи з 1 доби після КОС. Максимальне значення КП активності відносно контролю, у середньому у 7 разів, відмічено на 21 добу. Таке підвищення протеасомної активності у тканинах стравоходу підтверджує попередні дані про надмірну активацію протеолізу на 21 добу після травми та може свідчити про утворенню фіброзу в післяопікових ранах.

Таблиця 5

Хімотрипсиноподібна та каспазоподібна активність протеасом у стравоході щурів за умов кислотного опіку стравоходу, (ум.од./мг*хв), ($M \pm m$, $n=8$)

		контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ХТП активність	20s	3,09±0,14	2,19±0,09*	10,18±0,46*	13,19±0,59*	7,06±0,32*
	26s	6,41±0,29	2,24±0,11*	11,61±0,52*	14,82±0,67*	9,27±0,42*
КП активність	20s	0,53±0,02	1,11±0,05*	2,01±0,09*	2,25±0,11*	3,62±0,16*
	26s	0,92±0,04	2,01±0,09*	4,27±0,19*	3,84±0,17*	6,43±0,29*

*- $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Таке надмірне функціонування системи протеолізу призводить до деградації білкових молекул.

Білковий склад сироватки крові та слизової стравоходу за експериментального кислотного опіку стравоходу щурів. Оцінку якісного та кількісного білкового складу крові та слизової стравоходу було проведено за допомогою методу диск-електрофорезу. Проведені дослідження показали кількісні зміни вмісту білкових фракцій, як у сироватці крові, так і у слизовій стравоходу.

Електрофоретичний аналіз складу білків сироватки крові продемонстрував у всіх досліджених зразках наявність білкових фракцій з молекулярною масою від 15 до 168 кДа. У сироватці крові відбувалось зменшення вмісту альбумінової фракції, починаючи з 1 доби після опіку, при зростанні вмісту глобулінової фракції, до складу якої входять Ig G та С-реактивний білок. Рівень альбуміну знижується при порушеннях продукції білка в печінці або при активній його протеолітичній деградації [O'Connell T. X., 2005]. Зміни глобулінової фракції можуть свідчити про дисфункцію гуморальної ланки імунітету.

Електрофоретичного аналіз білків слизової стравоходу у всіх досліджених зразках виявив білкові фракції з молекулярною масою від 34 до 126 кДа. Показано підвищення вмісту фракцій білків ~56 кДа та ~ 49,6 кДа, які можуть відповідати кератину 4 і кератину 13 [Мельникова В.И., 2010], та фактору росту ендотелію ~34 кДа [Михайлусов Р. Н., 2014]. Такі зміни можуть свідчити про підвищену епітелізацію в місці опіку та ангиогенез. Білкові фракції з м.м. ~ 110 кДа та ~ 90 кДа можуть відповідати білкам теплового шоку Hsp110, які приймає участь у імунній відповіді і виживанні клітин під час стресу, та Hsp90, який приймає участь у рефолдингу та деградації білків [Ikwegbue P. C., 2017].

Внаслідок КОС встановлено утворення продуктів протеолізу - молекул середньої маси (МСМ), частина з яких має високу функціональну активність і при відповідних умовах може виступати в ролі токсичних активних факторів. Це низькомолекулярні пептиди, з м.м. 0,5-5 кДа. Загальний вміст МСМ в сироватці крові щурів за КОС був вище за контроль на 1 добу експерименту у 1,2 рази. З 15 доби ми спостерігали зниження показника, який на 21 добу був нижче за контроль у 1,2 рази. У слизовій оболонці стравоходу на 1 добу експерименту відбувалось зниження вмісту МСМ у 1,3 рази, порівняно з контролем. На 7 добу спостерігалась тенденція до підвищення показника, який на 21 добу був у 1,2 рази вище за контроль. Такі зміни можуть вказувати на деструкцію тканин стравоходу та порушення детоксикаційної функції організму, оскільки МСМ є маркером ендогенної інтоксикації [Нетюхайло Л.Г., 2005]

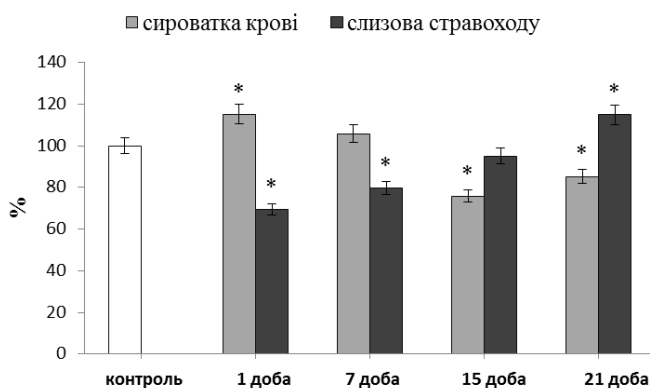


Рис.7. Відносний вміст молекул середньої маси (МСМ) у сироватці крові та слизовій стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу, (M±m, n=8)

*p<0,05 в порівнянні з контролем

МСМ є основними токсичними субстратами, які можуть впливати на життєдіяльність всіх органів і систем, а також здатні з'єднуватися з рецепторами будь-якої клітини і блокувати їх, неадекватно впливаючи на її метаболізм і функції [Разнатовская Е.Н., 2012]

Показники гуморальної ланки імунітету за кислотного опіку стравоходу.

Згідно отриманих даних електрофоретичного дослідження у сироватці крові виявлено зміни глобулінової фракції, до складу якої належить IgG. Також у ряді робіт продемонстровано, що продукти протеолітичної активності можуть бути універсальними маркерами різних аутоімунних процесів [Harpel P.C., 1989; Яковлев В.Н., 2017]. А молекули, що генеруються імунною системою, виступають в ролі молекулярних адаптерів для включення клітинних ефекторів ферментативної та сигнально-рецепторної дії [Васильев А.Г., 2018]. Одним із показників стану гуморальної ланки імунітету є рівень IgG. На 1 добу після опіку встановлено зниження показника, що відповідає стадії шоку (рис. 8). У пацієнтів з опіками рівень імуноглобулінів зменшується через підвищену швидкість їх зникнення. Це може бути пов'язано з підвищеним катаболізмом і втратою сироваткових імуноглобулінів через ексудати рани [Алексеев А.А, 2010]. Ми спостерігали підвищення концентрації IgG у 1,4 рази на 21 добу після опіку, що може свідчити про розвиток хронічних інфекційних процесів в організмі. Згідно літературних даних, у дітей із ХОС відзначається збільшення вмісту IgG в стадії токсемії і септикотоксемії [Wu B., 2015].

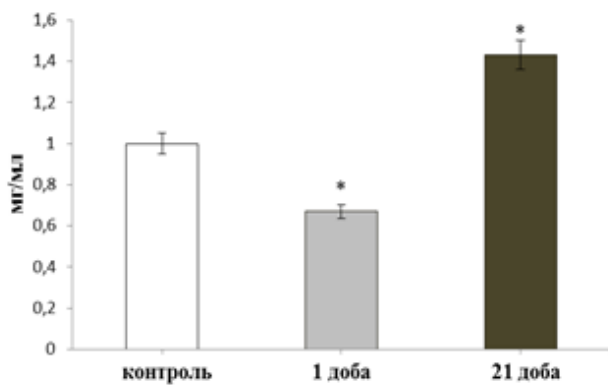


Рис. 8. Концентрація імуноглобулінів класу G у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=6$)
*- $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Одним з індикаторів стану імунного статусу організму є рівень ЦК в крові. При дослідженні вмісту високомолекулярних, середньомолекулярних та низькомолекулярних ЦК на 1 добу після опіку спостерігалась тенденція до збільшення їх рівня порівняно з показниками інтактного контролю в середньому у 1,3 - 1,4 рази (табл. 6). На 21 добу після опіку дані показники дещо знизилися, але залишилися вище контрольного рівня.

Таблиця 6

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

	Контроль	КОС	
		1 доба	21 доба
Високомолекулярні ЦК	0,10±0,001	0,13±0,002*	0,11±0,002*
Середньомолекулярні ЦК	0,14±0,001	0,18±0,002*	0,16±0,002*
Низькомолекулярні ЦК	0,12±0,001	0,17±0,002*	0,15±0,002*

* $p < 0,05$ в порівнянні з контролем

Такі зміни призводять до активації запального процесу, який проявляється викидом цитокінів. Нами було встановлено максимальне підвищення прозапальних цитокінів вже на 1-шу добу експерименту, що є відображенням активності і тяжкості патологічного процесу (табл. 7). В той же час вміст протизапального інтерлейкіну ІЛ-4 був зниженим протягом усього досліджуваного періоду, а вміст ІЛ-10 був вище контрольного показника лише на 7 добу після опіку. Так дисфункція цитокінового профілю свідчить про уповільнення загоєння опікової рани.

Таблиця 7

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

	контроль	7 доба	15 доба	21 доба
прозапальні				
ІЛ-1β	0,088±0,001	0,103±0,015	0,1±0,009	0,092±0,009
ІЛ-12	0,09±0,001	0,122±0,001*	0,11±0,001*	0,115±0,002*
ІФ-γ	0,077±0,004	0,091±0,007	0,085±0,003	0,085±0,009
ІЛ-6	0,063±0,003	0,073±0,004*	0,075±0,004*	0,084±0,003*
TNF-α	0,067±0,002	0,079±0,004*	0,074±0,002*	0,075±0,003*
протизапальні				
ІЛ-4	0,089±0,001	0,087±0,006	0,077±0,002*	0,08±0,003*
ІЛ-10	0,078±0,006	0,097±0,002*	0,069±0,008	0,07±0,002

*- p<0,05 в порівнянні з контролем

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

ВИСНОВКИ

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

1. Показано, що за кислотного опіку стравоходу підвищився вміст дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук та шифових основ на тлі зниження активності супероксиддисмутази, каталази, вмісту глутатіону та всіх глутатіон-залежних

ферментів, що обумовлено процесами надмірної продукції активних форм кисню, що зумовлює активацію протеолізу.

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

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

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

5. Показано зниження вмісту шаперонів та підвищення активності протеасом у тканинах стравоходу щурів, що свідчить про посилення протеолізу. На 21 добу після травми хімотрипсинподібна активність 26s протеасом у 1,4 рази вище за контроль, а каспазоподібна – у 7 разів.

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

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

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

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

2. **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, Серія: Біологія (Біологічні системи). 2015; 7(2): 143-8. (*Особистий внесок здобувача – визначення вмісту молекул середньої маси та олігопептидів, інтерпретація результатів та написання статті*).

3. **Коваль Т. В.**, Рослова Н.М., Раєцька Я. Б. Біохімічні та загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу II ступеня. Вісник Львівського університету. Серія: Біологічна. 2016; 73: 298-302. *(Особистий внесок здобувача – визначення загальноклінічних та біохімічних показників крові, аналіз результатів та написання статті).*

4. **Koval T.**, Ischuk T., Raetska Ya. Characteristics of immune response under experimental models of acid burns of the esophagus. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Biology. 2016; 72(2): 52-5. *(Особистий внесок здобувача – визначення концентрації імуноглобуліну G та циркулюючих імунних комплексів, інтерпретація результатів та написання статті).*

5. 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. International Journal of Health Sciences and Research. 2016; 6(12): 259-64. *(Особистий внесок здобувача – визначення протеолітичної активності за кислотного опіку стравоходу, інтерпретація результатів).*

6. 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, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017; 22(1): 36-9. *(Особистий внесок здобувача – проведення диск- електрофорезу, аналіз результатів та написання статті).*

7. Raetska Ya. B., Chornenka N. M., Koval T. V., Savchuk O. M., Beregova T. V., Ostapchenko L. I. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. Biomedical Research and Therapy. 2017; 4(9): 1591-1606. *(Особистий внесок здобувача – визначення вмісту цитокінів за кислотного опіку стравоходу, інтерпретація результатів).*

Тези наукових доповідей

1. **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 2016р.: матер. конфер. – Київ, 2016. – С.104-105

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

3. **Koval T. V.**, Ishchuk 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, 2016: матер.конфер. - Prague, Czech Republic 2016. - P.73

4. 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 2017р.: матер. конфер. – Київ, 2017. – С.78-79

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

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

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню протеолітичної деградації білків за кислотного опіку стравоходу (КОС) статевонезрілих щурів II ступеню тяжкості. Відтворена модель КОС супроводжувалась дисфункцією систем протеолізу, антиоксидантного захисту та імунної системи. Виявлені кількісні зміни вмісту білкових фракцій, як у сироватці крові так і у слизовій стравоходу.

Продемонстровано підвищення вмісту всіх досліджуваних матриксних металопротеїназ (ММП), тканинного інгібітора металопротеїназ (ТІМП-1), фактору росту фібробластів (bFGF) у слизовій оболонці стравоходу на 21 добу після опіку. Також, в даний термін часу, значного підвищення зазнавала каспазоподібна активність протеасом. На 7 добу експерименту відбувалось підвищення загальної протеолітичної активності та інгібіторної активності α_2 – макроглобуліну у крові. Такі зміни свідчать про надмірну активність протеолітичних процесів та дисбаланс у системі протеолізу.

За кислотного опіку відбувалось підвищення вмісту продуктів переокислення ліпідів на тлі зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, що обумовлено процесами надмірної продукції активних форм кисню.

Показано підвищення концентрації IgG на 21 добу після опіку. Вміст середньо- і низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та прозапальних цитокінів підвищувався на 1 добу після опіку на тлі дефіциту протизапальних цитокінів. Такі зміни можуть свідчити про розвиток запальних і інфекційних процесів та уповільнення загоєння опікової рани.

Ключові слова: кислотний опік стравоходу, протеоліз, деградація білків.

АННОТАЦИЯ

Коваль Т.В. Протеолитическая деградация белков как фактор метаболической дисфункции при кислотном ожоге пищевода. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию протеолитической деградации белков при кислотном ожоге пищевода (КОП) неполовозрелых крыс II степени тяжести. Воссозданная модель КОП сопровождалась дисфункцией систем протеолиза, антиоксидантной защиты и иммунной системы. Выявлены количественные изменения содержания белковых фракций, как в сыворотке крови, так и в слизистой оболочке пищевода. В сыворотке крови отмечено уменьшение содержания альбуминов и увеличение содержания глобулинов. Исследование содержания белков ткани пищевода показало увеличение содержания фракции, которая может соответствовать кератинам и фактору роста эндотелия, что может свидетельствовать о повышенной эпителизации в ожоговой ране.

Продемонстрировано повышение содержания всех исследуемых матричных металлопротеиназ (ММП), тканевого ингибитора металлопротеиназ (ТИМП-1), фактора роста фибробластов (bFGF) в слизистой оболочке пищевода на 21 сутки после ожога. Также, в исследуемый промежуток времени, была повышена каспазоподобная активность протеасом. Увеличение активности протеасом может свидетельствовать об образовании фиброза в послеожоговых ранах.

На 7 сутки эксперимента происходило повышение общей протеолитической активности и ингибиторной активности $\alpha 2$ - макроглобулина в крови. В последующие периоды времени общая протеолитическая активность была ниже контроля, что может свидетельствовать об образовании комплексов с ингибиторами и элиминации ферментов из крови. Такие изменения свидетельствуют о чрезмерной активности протеолитических процессов и дисбалансе в системе протеолиза.

При кислотном ожоге происходило повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты, что обусловлено процессами избыточной продукции активных форм кислорода.

Показано повышение концентрации IgG на 21 сутки после ожога. Содержание средне- и низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и провоспалительных цитокинов повышалось на 1 сутки после ожога на фоне дефицита противовоспалительных цитокинов. Такие изменения могут свидетельствовать о развитии воспалительных и инфекционных процессов и о замедлении заживления ожоговой раны.

Ключевые слова: кислотный ожог пищевода, протеолиз, деградация белков.

SUMMARY

Koval T.V. Proteolytic degradation of proteins as a factor of metabolic dysfunction in the esophagus acid burn. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation is devoted to investigation of proteolytic degradation under II degree of the esophagus acid burn (EAB) in immature rats. The model of EAB was accompanied by proteolytic system dysfunction, antioxidant defences abnormalities and immune disorders. Quantitative alterations in the content of protein fractions, both in blood serum and in the mucosa of the esophagus under experimental EAB were established.

The increase in the content of all the studied matrix metalloproteinases (MMP), the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1), the fibroblast growth factor (bFGF) in the mucosa of the esophagus for the 21st day after the burn was demonstrated. Also, during the studied period, caspase-like proteasome activity was increased. An increase in proteasome activity may indicate the formation of fibrosis in post-burn wounds. The total proteolytic activity and the inhibitory activity of $\alpha 2$ -macroglobulin on the 7th day after EAB development in the blood was increased. Such changes indicate excessive activity of proteolytic processes and imbalance in the proteolysis system functioning.

Besides, the present study revealed increase of lipid peroxidation products content, decrease of antioxidant enzymes activities, due to processes of reactive oxygen species excessive production under esophagus acid burn.

It was demonstrated that IgG concentration increased on the 21 day after the esophagus burn. The content of medium- and low-molecular-weight circulating immune complexes (CIC) and proinflammatory cytokines increased by the 1 day after EAB, that was accompanied anti-inflammatory cytokine deficiency. The established changes may indicate development of inflammatory and infectious processes and delay of burn wound healing.

Keywords: esophagus acid burn, proteolysis, protein degradation.