Раєцька Яна Борисівна, старший науковий співробіт&shy;ник відділення біологічних та біомедичних технологій НДЛ &laquo;Фармакологія та експериментальна патологія&raquo; ННЦ &laquo;Ін&shy;ститут біології та медицини&raquo; Київського національного уні&shy;верситету імені Тараса Шевченка: &laquo;Біохімічні механізми за хімічного опіку&raquo; (03.00.04 - біохімія). Спецрада Д 26.001.24 у Київському національному університеті імені Тараса Шев&shy;ченка

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 24

ВСТУП 26

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ

ЗАГОЄННЯ ОПІКІВ ТА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛІЗУ 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

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. 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

21

2.10.8 Визначення концентрації магнію 70

2.10.9 Визначення концентрації кальцію 70

2.10.10 Визначення активності аспартатамінотрансферази (АСаТ) 71

2.10.11 Визначення активності аланінамінотрансферази (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 α1-антитрипсину та

α2- мактроглобуліну

85

22

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 ЗT-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 93

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 135

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 191

5.1 Процеси загоєння за умов хімічного опіку стравоходу 191

23

РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА МОЛЕКУЛЯРНОБІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ (ЗАГОЄННЯ) ТА

РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ ЗА

УМОВ ХІМІЧНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ 203

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

РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ДОСЛІДЖЕННЯ 247

ВИСНОВКИ 271

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 273

ДОДАТКИ 315

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

Встановленіособливостізрушеньосновнихметаболічнихпроцесівв

організміщурівзаумовкислотноготалужногоопікуслизовоїоболонки

стравоходу

Встановленопідвищеннярівняпрозапальнихцитокінівпісляопіку

натлідефіцитупротизапальнихцитокінівщосупроводжувалося

підвищеннямконцентраціїтавмістусередньойнизькомолекулярних

ЦІКТакізміницитокіновогопрофілюспівпадаютьзактивацієюпротеолізу

тасвідчатьпроуповільненнязагоєнняопіковоїрани

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

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α–макроглобулінута

активностісериновихтаметалопротеїназуплазмікрові



Доведенощозаопікустравоходувідбуваєтьсяпротеолітична

деградаціябілківтканинистравоходуПрицьомуспостерігаютьсякількісні

змінивмістубілковихфракційпоказанопідвищеннявмістуТІМПфактора

ростуфібробластівМСМтавсіхдосліджуванихММПщоможесприяти

накопиченнюбілківміжклітинногоматриксутасвідчитьпродисбалансу

системіпротеолізу

Показанопозитивнийвпливмеланінунаключовіланкибіохімічних

процесівзапальнийпроцестаокисноантиоксидантнурівновагузахімічного

опікустравоходу

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