Коваль Тетяна Валентинівна, провідний інженер НДЛ &laquo;Фізико-хімічна біологія&raquo; відділення експериментальної біології ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України: &laquo;Протеолітична деградація білків як фактор ме&shy;таболічної дисфункції за кислотного опіку стравоходу&raquo; (03.00.04 - біохімія). Спецрада Д 26.001.24 у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

КОВАЛЬ ТЕТЯНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК: 616.329-001.37-053

ДИСЕРТАЦІЯ

ПРОТЕОЛІТИЧНА ДЕГРАДАЦІЯ БІЛКІВ ЯК ФАКТОР МЕТАБОЛІЧНОЇ

ДИСФУНКЦІЇ ЗА КИСЛОТНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Коваль Т.В.

Науковий керівник Остапченко Людмила Іванівна доктор біологічних наук,

професор.

Київ – 2018

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ………………………………………. 18

ВСТУП………………………………………………………………………... 20

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОПІКИ ТА СИСТЕМУ

ПРОТЕОЛІЗУ……………………………………………………………….. 26

1.1. Метаболічні порушення за опікової хвороби…….……….……. 26

1.2. Екстрацелюлярний та цитоплазматичний протеоліз ………… 32

РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи………….………………………………….. 42

2.1. Реактиви та обладнання…………………………………………… 42

2.2. Дотримання положень про гуманне ставлення до тварин ……... 43

2.3. Умови проведення експерименту ……………………………….. 43

2.4. Отримання сироватки кров ………………………………..….….. 44

2.5. Отримання плазми крові …………………………………………. 44

2.6. Отримання слизової оболонки стравоходу……………………… 44

2.7. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд ………… 45

2.8. Гістологічні методи дослідження……………...………………… 45

2.9. Дослідження морфофункціонального стану клітин крові у

щурів ………………………………………………………………. 46

2.10 Визначення біохімічних параметрів сироватки крові………..…. 46

2.10.1. Визначення загального білка сироватки крові……………….…. 47

2.10.2. Визначення концентрації альбуміну…………………………….. 47

2.10.3. Визначення концентрації сечовини………………………….…... 47

2.10.4. Визначення концентрації креатиніну…………………….…...…. 48

2.10.5. Визначення концентрації іонів натрію……………………........... 48

2.10.6. Визначення концентрації іонів калію………………..……….…. 49

2.10.7. Визначення концентрації хлоридів.…………………………….... 49

2.10.8. Визначення концентрації магнію………………………………… 49

2.10.9. Визначення концентрації кальцію……………………………… 50

16

2.10.11. Визначення активності аспартатамінотрансферази…………….. 50

2.10.12. Визначення активності аланінамінотрансферази…………….… 50

2.11. Визначення вмісту дієнових кон‟югатів і шифових основ

ненасичених жирних кислот ……………………………………... 51

2.12. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів……………………. 51

2.13. Визначення активності супероксиддисмутази………………...... 52

2.14. Визначення активності каталази…………………………………. 53

2.15. Визначення концентрації SH-груп……………………………… 53

2.16. Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону…… 54

2.17. Визначення глутатіонпероксидазної активності………………... 54

2.18. Визначення глутатіонтрансферазної активності………………... 55

2.19. Визначення глутатіонредуктазної активності………………..… 56

2.20. Визначення вмісту молекул середньої молекулярної маси…… 56

2.21. Електрофорез у поліакриламідному гелі ……………………….. 57

2.22. Визначення протеасомної активності…………………………… 58

2.23. Визначення вмісту циркулюючих імуних комплексів……….… 58

2.24. Визначення активності α1-антитрипсину та α2-мактроглобуліну 59

2.25. Визначення загальної протеолітичної активності та активності

метало- та серинових протеїназ…………………………………. 60

2.26. Імуноферментний аналіз…………………………………………. 61

2.27. Статистична обробка результатів…………………………........ 62

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень і їх обговорення…………….…………. 63

3.1. Особливості функціонування організму щурів за кислотного

опіку стравоходу …………………………………………...……..... 63

3.2. Cтан системи перекисного окиснення ліпідів та функціонування

системи антиоксидантного захисту за кислотного опіку

статевонезрілих щурів……………………………………………….. 76

3.3. Протеолітична деградація білків за кислотного опіку стравоходу. 90

17

3.3.1. Показника системи протеолізу за кислотного опіку стравоходу

статевонезрілих щурів …………………………………………….. 90

3.3.2. Дослідження вмісту шаперонів та активності протеасом у

тканині стравоходу за кислотного опіку стравоходу

статевонезрілих щурів …………………………………………..…. 103

3.3.3. Зміни білкового складу сироватки крові та слизової оболонки

стравоходу за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих

щурів………………………………………………………………….. 109

3.3.4. Молекули середньої маси у тканинах щурів за кислотного опіку

стравоходу……………………………………………………………. 116

3.4. Показники гуморальної ланки імунітету за кислотного опіку

стравоходу…………………………………..…….…….…………..... 120

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ …….... 131

ВИСНОВКИ………………………………………………………………..…. 138

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ………..………………………….. 140

ДОДАТОК 1………………………………………………………………..…. 163

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

Показанощозакислотногоопікустравоходувідбувалосьпідвищення

вмістудієновихкон‟югатівТБКактивнихсполукташифовихосновнатлі

зниженняактивностісупероксиддисмутазикаталазивмістуглутатіонутавсіх

глутатіонзалежнихферментівщообумовленопроцесаминадмірноїпродукції

активнихформкиснющозумовлюєактиваціюпротеолізу

Встановленощонадобуекспериментузакислотногоопіку

стравоходувідбувалосьпідвищенняінгібіторноїактивностіα–макроглобуліну

укровівразитаактивностісериновихтаметалопротеїназвплазмікровів

таразивідповідно

Показанопідвищеннявмістутканинногоінгібітораметалопротеїназу

разифакторуростуфібробластівуразимолекулсередньоїмасиу

разитавсіхдосліджуванихматрикснихметалопротеїназуразиуслизовій

оболонцістравоходунадобущоможесвідчитипродисбалансусистемі

протеолізу

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добууразианадобууразипризростаннівмісту

глобуліновоїфракціїутаразивідповідновідносноконтролю

Показанозниженнявмістушаперонівтапідвищенняактивності

протеасомутканинахстравоходущурівщосвідчитьпропосилення



протеолізуНадобупіслятравмихімотрипсинподібнаактивність

протеасомуразивищезаконтрольакаспазоподібна–уразів

Встановленощоопікстравоходусупроводжувавсяпідвищенням

концентраціїтавмістусередньоінизькомолекулярнихЦІКусироватці

кровіТакнадобупіслятравмиконцентраціяуразивміст

середньоінизькомолекулярнихЦІКутаразивідповідновище

контрольнихпоказників

Оцінкацитокіновогопрофілюякмаркеруметаболічнихпорушеньу

сироватцікровіпоказалапідвищеннярівняпрозапальнихцитокініву

сироватцікровінадобупісляопікунатлідефіцитупротизапальних

цитокінівТакізміницитокіновогопрофілюкорелюютьзактивацією

протеолізутасвідчитьпроуповільненнязагоєнняопіковоїрани