ІЩУК ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА. Назва дисертаційної роботи: "УЧАСТЬ ПРОЦЕСІВ ПРОТЕОЛІЗУ У РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ"

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ІЩУК ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА

УДК: 616.329-001.37-053

УЧАСТЬ ПРОЦЕСІВ ПРОТЕОЛІЗУ У РОЗВИТКУ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

03.00.04-біохімія

Дисертація

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник

доктор біологічних наук, професор

Людмила Іванівна Остапченко

Київ – 2015

2

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОРИСТАННИХ СКОРОЧЕНЬ…………………………. 5

ВСТУП………………………………………………………………………... 7

РОЗДІЛ 1. Огляд літератури………...…………………………………... 12

1.1. Загальні відомості про хімічні опіки

стравоходу……………………………………………………………. 12

1.1.2. Класифікація та механізм дії каустичних агент…………............... 14

1.2. Біохімічні механізми загоєння після опікових ран…………….….. 19

1.2.1. Протеолітичні процеси у екстрклітиному матриксі за умов

норми та ранового процесу………………………...……………….. 25

1.2.2. Особливості структури та функціонування матриксних

металопротеїназ у фізіологічних процесах загоєння ран…………. 28

РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи………….………………………………..... 33

2.1. Реагенти та матеріали……………………………………………….. 33

2.2. Обладнання……………………………………………..……..……… 33

2.3. Дотримання положень про гуманне відношення до

тварин………......................................................................................... 34

2.4. Умови проведення експерименту…………………………….…….. 35

2.5. Отримання сироватки крові…………………………………….….... 35

2.6. Отримання плазми крові……………………………………….….… 36

2.7. Отримання слизової оболонки стравоходу………………………… 36

2.8. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд………….… 36

2.9. Визначення біохімічних параметрів сироватки крові………..……. 36

2.9.1. Визначення загального білка сироватки крові………………….…. 36

2.9.2. Визначення концентрації альбуміну……………………………….. 37

2.9.3. Визначення концентрації сечовини…………………………….…... 37

2.9.4. Визначення концентрації креатиніну…………………….……...…. 37

2.9.5. Визначення концентрації іонів натрію Na+……………………........ 38

2.9.6. Визначення концентрації іонів К+……………………………….…. 38

3

2.9.7. Визначення концентрації Cl –………………………………………. 39

2.9.8. Визначення активності аспартатамінотрансферази……………….. 39

2.9.9. Визначення активності аланін амінотрансферази……………….… 40

2.10. Визначення вмісту молекул середньої молекулярної

маси………..…...................................................................................... 40

2.11. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності

додецилсульфату натрію…………………………………………….. 41

2.12. Метод ензим-електрофорезу………………………………….…….. 41

2.13. Визначення вмісту циркулюючих імуних комплексів……….….… 42

2.14. Одержання та характеристика поліклональних антитіл………....... 42

2.15. Метод вестерн-блотингу…………………………………………….. 43

2.16. Отримання фракції тромбоцитів………………………………….… 43

2.17. Визначення активності α1-антитрипсину та α2-

мактроглобуліну……………………………………………………... 44

2.18. Визначення загальної протеолітичної активності та активності

метало- та сери нових протеїназ……………………………………. 46

2.19. Гістологічні методи дослідження…………………………............... 47

2.20. Імуноферментний аналіз……………………………………………. 48

2.21. Статистичнаобробка результатів………………………………........ 48

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень і їх обговорення……………………. 49

3.1. Біохімічні особливості функціонування організму за умов

розвитку хімічного опіку стравоходу……………………………..... 49

3.1.2. Зміни білкового складу сироватки крові та тканин стравоходу

за розвитку експериментального опіку стравоходу…………...…... 67

3.2. Показника системи протеолізу за розвитку лужного опіку

стравоходу……………………………………………………………. 77

3.3. Показники гуморальної ланки імунітету за розвитку

опіку стравоходу…………………………………………………..…. 94

3.4. Рівень ендогенної інтоксикації за розвитку лужного

4

опіку стравоходу…………………………………….…….………..... 102

РОЗДІЛ 4. Заключення…………….……………………………………….. 106

ВИСНОВКИ…………………………………………………………………. 113

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ………..……………………….. 115

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АСТ – аспартатаминотрансфераза;

АЛТ – аланінамінотрансфераза;

ШКТ– шлунково-кишковий тракт

ЛОС– лужний опік стравоходу;

ХОС – хімічний опік стравоходу;

ММП – металопротеїнази;

TIMП – танинні інгібітори металопротеїназ;

ЦІК – циркулюючі імунні комплекси;

ПААГ – поліакриламід;

ДСН – додецилсульфатнатрію;

α2-МГ – макроглобулін;

α1-АТ– антитрипсин;

ЕЦМ – екстрацелюляркий матрикс;

ФМСФ – фенілметил сульфоніл флуорид;

ЕДТА – етилендіамінтетраацетат;

МСК– мезенхімальні стовбурові клітини;

МСМ – молекули середньої маси;

IgG– імуноглобуліни класу G;

БАЕЕ – N-бензоїл-L-аргінін- етиловий ефір;

FGF – фактор росту фібробластів;

TGF – трансформуючий фактор росту;

IL – інтерлійкін;

VEGF – фактор росту ендотелію судин;

EGF – епідермальний фактор росту;

PDGF – тромбоцитарний фактор росту;

TNF-α – фактор некрозу пухлин;

БСА – бичачий сироватковий альбумін;

6

Hps – білок теплового шоку;

PAI-1– активатор плазміногену 1 типу;

t-PA – тканинний активатор плазміногену.

7

ВСТУП

Актуальність теми. Хімічні опіки стравоходу є одними з

найпоширеніших набутих захворювань стравоходу в дитячому віці. При цьому

ступінь пошкодження тканини залежить насамперед від хімічного складу

спожитого агенту, особливо важкі ураження спостерігають при опіку

концентрованими лугами [1]. Згідно даних статистики, максимальна кількість

таких отруєнь (від 77% до 85%) припадає на вік від 1 до 8 років [2,3]. В останні

роки кількість пацієнтів з хімічними опіками верхніх відділів шлунковокишкового тракту (ШКТ) не зменшується, а продовжує неухильно зростати

[4].

Існує ряд патологій та ускладнень, які є наслідком постопікових змін

стравоходу: гіпоксія тканин, набряк гортані, некроз стінок ШКТ, токсичний

генералізований шок організму тощо. Основним наслідком опікових уражень

стравоходу є формування рубців. Лише в 30% випадків завершення

післяопікового ураження стравоходу відбувається без утворення рубців,

відповідно, у 70 % пацієнтів формуються перманентні сполучнотканинні

утворення слизової оболонки (рубці) [5,6].

На сьогодні встановлено, що основними причинами утворення рубців є

недостатня активність ферментних систем, які відповідають за деградацію

екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), зокрема металопротеїназ (ММП) [7,8], а

також посилення процесів проліферації фібробластів, що, в свою чергу,

призводить до продукції компонентів ЕЦМ. Незважаючи на численні

дослідження, на сьогодні залишаються нез’ясованими причини виникнення

рубців. Наукові уявлення про процеси рубцювання ШКТ на клітинному та

молекулярному рівнях, наразі, залишаються недостатньо вивченими. Стан

зазначеної проблеми ускладнюється ще й тим, що дотепер не розроблено

адекватних експериментальних моделей для дослідження рубцювання слизової

оболонки стравоходу.

8

У зв’язку з зазначеним актуальними є дослідження механізмів, які

лежать в основі регенерації тканин стравоходу. Так, відомо, що в результаті

протеолітичного розпаду відбувається відторгнення пошкоджених тканинних

елементів, що є необхідною умовою нормального перебігу репаративних

процесів [9]. У той же час надмірне накопичення компонентів ЕЦМ та

зниження активності протеолітичних ферментів може призводити до

утворення рубців [10]. У літературі відсутні дані про закономірності змін

протеїназ та їх інгібіторів у тканинах стравоходу та кровотоці післяопікових

травм. Отримання таких експериментальних даних дало б змогу оцінити

характер перебігу репараційних процесів за розвитку, зокрема, лужного опіку

стравоходу, та, відповідно, розробити ефективні методи спрямованої корекції

протеолізу.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового

центру «Інститут біології» Київського національного університету імені

Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми “Механізми реалізації

адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних

патологій” (2011-2015 рр., № д/р 0111U004648).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було з’ясування участі

системи протеолізу в розвитку експериментального опіку стравоходу.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Відтворити модель лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступенів тяжкості на

статевонезрілих щурах.

2. Визначити морфологічні, цитологічні та біохімічні параметри тканин за

розвитку лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступенів тяжкості.

3. Оцінити білковий склад сироватки крові та слизової оболонки

стравоходу статевонезрілих щурів за умов розвитку лужного опіку стравоходу

1 та 2 ступенів тяжкості.

9

4. Визначити співвідношення протеїназ та їх інгібіторів у плазмі та

слизовій оболонці стравоходу за умов розвитку лужного опіку 1 та 2 ступенів

тяжкості.

5. Дослідити рівень циркулюючих імунних комплексів та вміст

імуноглобулінів класу G у сироватці крові статевонезрілих щурів за умов

розвитку лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступенів тяжкості.

6. Визначити рівень ендогенної інтоксикації після моделювання опіку

стравоходу.

Об’єкт дослідження: система протеолізу слизової оболонки стравоходу

та плазми крові за норми та розвитку експериментальної моделі лужного опіку

1 та 2 ступенів тяжкості.

Предмет дослідження: функціонування ключових компонентів системи

протеолізу плазми крові та тканин стравоходу за розвитку експериментального

лужного опіку стравоходу 1 та 2 ступенів тяжкості.

Методи дослідження. Афінна хроматографія, диск-електрофорез, ензимелектрофорез, вестерн-блотинг, твердофазний імуноферментний аналіз

(тІФА), гістологічні, спектрофотометричні та статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше відтворено моделі

лужного опіку стравоходу 1 (ЛОС 1) та 2 (ЛОС 2) ступенів на статевонезрілих

щурах, які супроводжувались відповідними морфологічними змінами тканин

та змінами ключових біохімічних показників сироватки крові.

Вперше проведено дослідження співвідношення активності

протеолітичних ферментів та їх інгібіторів в кровотоці, а також та слизовій

оболонці стравоходу за розвитку ЛОС 1 та 2. Показано, що за розвитку

рубцевих змін відбувається підвищення вмісту тканинних інгібіторів

металопротеїназ (ТІМП-1) та зниження активності ММП в тканинах

стравоходу.

Встановлено, що розвиток опіку стравоходу супроводжується загальною

інтоксикацією організму протягом першого тижня після травми, на що вказує

підвищення рівня молекул середньої маси (МСМ). Також було

10

продемонстровано, що за даної патології відбувались зміни вмісту білкових

фракцій слизової оболонки стравоходу та сироватки крові експериментальних

тварин.

Показано, що розвиток опіку стравоходу супроводжувався підвищенням

вмісту IgG та суттєвою зміною молекулярного складу імунних комплексів

сироватки крові щурів, що відображалось у підвищенні концентрації найбільш

токсигенних – середньо- та низькомолекулярних циркулюючих імунних

комплексів (ЦІК).

Практичне значення одержаних результатів. Отримані у роботі

результати розширюють уявлення щодо розуміння молекулярно-біохімічних

аспектів загоєння післяопікових ран стравоходу. Представлені дані можуть

бути використані для пошуку потенційних молекул-мішеней для розробки

цілеспрямованого медикаментозного впливу на процеси регенерації

післяопікових ран стравоходу та профілактики утворення рубців слизової

оболонки ШКТ.

Окремі положення дисертаційної роботи та методи досліджень можуть

бути впроваджені у навчальний процес на біологічних факультетах

університетів та медичних вузів при розробці курсу з вивчення молекулярних

та біохімічних аспектів патологічних станів.

Особистий внесок здобувача. Проведення експериментів, обробка та

теоретичне пояснення первинних результатів досліджень та формулювання

висновків виконано дисертантом особисто. Автором самостійно проведено

збір та аналіз наукової літератури за темою дисертації, статистичну обробку

результатів експериментів, підготовку статей.

Вибір теми дисертаційної роботи, постановка мети, планування

напрямків досліджень та розробка методичних підходів, узагальнення

результатів і редагування тексту дисертаційної роботи проведено спільно з

науковим керівником. Автор висловлює вдячність д.б.н. Савчуку О.М. за

допомогу у виконанні окремих розділів роботи, співучасть якого відмічена в

спільних публікаціях.

11

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації доповідались

на вітчизняних та міжнародних конференціях: IX Міжнародній науковій

конференції “Молодь та поступ в біології” (Львів, 2013), VІІ Міжнародній

конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків,

2012), 7th of Experimental and Clinical Biochemistry (Lviv, 2013), XI

Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених

“Шевченківська весна” (Київ, 2013), 38th 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 та аспірантів “Молодь та поступ в біології” (Львів,

2014), 39th FEBS EMBO Conference (Paris, France 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 16 наукових праць, з яких:

5 статей у фахових періодичних виданнях, з яких 2 публікації у виданнях,

включених до міжнародних наукометричних баз. А також 10 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 (218 посилань). Дисертаційна

робота викладена на 135 сторінках і проілюстрована 31 рисунком та 3

таблицями.

ВИСНОВКИ

Представленадисертаційнароботаприсвяченадослідженнюучасті

системипротеолізуурозвиткупостопіковихзмінслизовоїоболонки

стравоходуПроведенідослідженнядозволиливстановитипорушення

співвідношенняпротеолітичнихферментівяківідповідаютьза

ремоделюванняЕЦМтаїхінгібіторіввкровотоцітаслизовійстравоходуза

розвиткурубцевихзмін

Відтворенімоделілужногоопікустравоходутаступенівтяжкості

настатевонезрілихщурахщосупроводжувалисявідповідними

морфологічнимиураженнямислизовоїоболонкистравоходутазмінами

основнихбіохімічнихпоказниківусироватцікрові

Встановленозмінивмістубілковихфракційуслизовійоболонці

стравоходутасироватцікровіщурівзаумоврозвиткуЛОСтаступенів

тяжкості

ПоказанощонадобуекспериментузаумоврозвиткуЛОС

ступенявідбувалосьпідвищеннярівняα–макроглобулінувсироватцікровів

разитаактивностісериновихтаметалопротеїназвплазмікровівта

разивідповідно

ВстановленопідвищеннявмістуТІМПвразитазниження

активностіметалопротеїназвразиуслизовійоболонцістравоходуна

добущоможесвідчитипророзвитокрубцевихзмінзаумовмоделювання

ЛОСступеня

Показанощорозвитокопікустравоходусупроводжувався

підвищеннямконцентраціївтаразизаумоврозвиткуЛОСта

ступенівтяжкостівідповіднопорівнянозконтрольнимизначеннямиВміст

середньотанизькомолекулярнихЦІКвсироватцікровіпіддосліднихщурів

післямоделюванняЛОСступеняперевищувавконтрольнівтарази

відповідно



ВстановленопідвищеннявмістуМСМуплазмікровіщурівяким

моделювалиопікстравоходутаступенящосвідчитьпроендогенну

інтоксикацію