

ЗМІНИ БІЛКОВОГО СКЛАДУ ГОМОГЕНАТУ СТРАВОХОДУ ЗА РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ ЩУРІВ

Іщук Т.В., Раєцька Я.Б., Савчук О.М.

Національний науковий центр «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

За останні десятиріччя відзначається стабільне збільшення числа хімічних опіків стравоходу. Рубцеві зміни стравоходу, що розвиваються в результаті опіку, залишається однією з найбільш складних проблем. Не дивлячись на багаточисельні дослідження, недостатньо вивчені питання загоєння та процесів рубцювання на клітинному та молекулярному рівні. Нами було показано кількісні зміни білкового складу за умов розвитку лужного опіку стравоходу. Подальше дослідження процесу загоєння може бути корисним для створення ефективних підходів для профілактики утворення рубцевих змін стравоходу.

Ключові слова: опік стравоходу, білкові фракції, електрофорез, фактори росту, луг.

Постановка проблеми. За даними Всесвітньої Організації Охорони здоров'я відзначається стабільне збільшення числа хімічних опіків стравоходу, що прямо зв'язано з наявністю великої кількості порівняно доступних технічних і побутових агресивних рідин, синтезованих у результаті науково-технічного прогресу людства [1]. За даним Американської асоціації токсикологічних центрів, тільки в 2010 р. сталося понад 1,6 млн. випадків вживання дітьми потенційно небезпечних хімічних речовин, з них в 18-46% випадків – вживання побутових речовин лужної природи [2]. До ранніх наслідків хімічних опіків стравоходу (ХОС) належать набряк гортані, екзотермічний шок, кровотеча, некроз стінки стравоходу [3]. Проте основним наслідком опікових уражень стравоходу є формування рубців стравоходу [4].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Опікові травми викликають безліч молекулярних змін, які відбуваються локально в ділянці ушкодження, а також на рівні організму. В місці локалізації хімічної травми підвищуються процеси синтезу та деградації білків. Як наслідок, порушуються структура і функції життєво важливих органів, таких як скелетні м'язи, шкіра, імунна система [5; 6]. Аналіз літератури показав, що молекулярні механізми процесу загоєння післяопікових ран вивчені недостатньо адже стосується, в основному, дослідження ролі окремих білків в рановому процесі [7; 8].

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Певний практичний і теоретичний інтерес становить дослідження білкових фракцій гомогенату стравоходу, які можуть відкрити нові перспективи для лікування опікових ран та профілактики рубцювання.

Мета статті. Визначити зміни вмісту білкових фракцій гомогенату стравоходу за розвитку лужного опіку стравоходу 1-го та 2-го ступеня.

Методи та матеріали. У досліджах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90-110 г (відповідають 3-4-х річному віку дітей), із дотриманням загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства в цій галузі. Всіх тварин, яких було використано в досліджах, утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам експериментально моделювали опік стравоходу розчином 10% та 20% NaOH [9]. Методом виведення тварин із досліду була цервікальна дислокація. Гомогенати стравоходу для дослідження відбирали на 1,7,15 та 21-шу добу, які відповідають стадіям

опікової хвороби. Розділення білкових фракцій сироватки крові щурів проводили методом диск електрофорезу у 10% поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності додецилсульфату натрію (ДСН) за модифікованим методом Леммлі [10]. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму Total Lab 2.01. Загальний білок визначали за методом Бредфорд [11]. Калібрувальну криву будували, використовуючи розчин БСА в якості стандарту. Будували графік залежності поглинання А595 від концентрації стандарту. Концентрацію білка визначали по калібрувальній кривій.

Вмісту bFGF (фактора росту фібробластів) визначали в гомогенатах стравоходу визначали методом ELISA [12]. Досліджувані зразки (10мкг/мл в 50 мМ Тріс-НСІ буфері (рН 7,4)) об'ємом 100 мкл інкубували в лунках 96-лункового планшету протягом ночі при 4°C. Для детекції вмісту bFGF у зразках використовували первинні кролячі поліклональні антитіла проти щурячого bFGF, які виявляли за допомогою вторинних антикролячих антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Bio-Rad, США). Як субстрат пероксидазної реакції, у роботі використовували о-фенілендіамін / пероксид водню (Sigma, США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм. Значення оптичної густини були використані для вираження вмісту bFGF в умод.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми Excel. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Ст'юдента (t). При цьому достовірними вважались різниці $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Електрофоретичний аналіз білкового складу гомогенату стравоходу піддослідних тварин показав у всіх досліджуваних зразках, як у контрольних, так і за умов хімічного опіку стравоходу 1-го та 2-го ступеня присутність білкових фракцій з молекулярними масами від 34 до 126 кДа. Проведені дослідження не виявили якісних змін білкового вмісту у гомогенатах стравоходу, однак можна відзначити їх кількісні зміни. Так, нами було показано поступове зростання вмісту фракцій з м.м. 72 кДа. Вміст даної фракції перевищував контрольні значення на 1-шу добу на 93% та 216% за розвитку ЛОС 1-го та 2-го ступеня відповідно. Зазначена фракція може відповідати білку теплового шоку Hsp70. З літературних даних відомо, що вміст зазначеного білка корелює зі ступенем опіку. Фізіологічна роль Hsp70 вивчалася на багаточисленних моделях за таких умов,

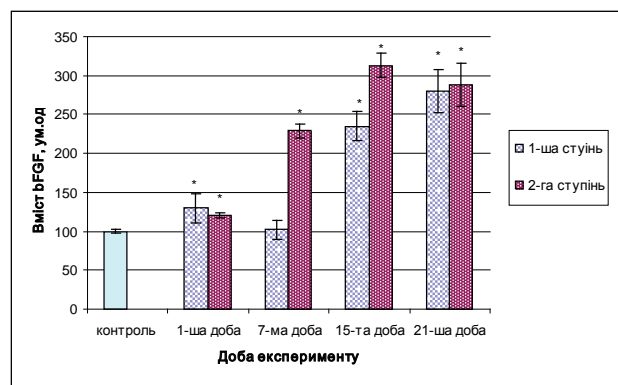
як гіпертермія, гіпертензія, гіпоксія, ішемія, запалення, аутоімунні патології, апоптоз, злоякісні пухлини, а також після контакту клітин з хімічними речовинами [13; 14]. Підвищення рівня Hsp70, можливо, пов'язано з основною здатністю зазначених білків зв'язувати пошкоджені, денатуровані білки в результаті деструктивної дії лужних речовин та захистом процесів біосинтезу білків. Фракція з м.м. 90кДа може відповідати ще одному білку телового шоку – Hsp90. Вміст даної фракції підвищувався на 1-шу, 7-му та 15-ту добу на 75%, 87% та 25% за умов моделювання ЛОС 1-го ступеня відповідно. За розвитку ЛОС 2-го ступеня вміст фракції з м.м. 90 кДа підвищувався на 1-шу, 7-му, 15-ту та 21-шу добу на 45%, 112%, 40% та 25% відповідно. З даних літератури відомо, що загальний рівень даного білку в клітині 1-2%, однак його рівень збільшується за умов дії температури та стресових факторів на клітини [15]. Ряд авторів показали підвищення вмісту Hsp70, Hsp90 білків в тканинах після опіку, що обумовлено підтримкою клітинного гомеостазу [16; 5].

Аналіз електрофореграм показав зростання фракції з м.м. 58 кДа на 15-ту добу експерименту на 28% та 81% після моделювання ЛОС 1-го та 2-го ступеня. Показано підвищення вмісту білкової фракції з м.м. 50 кДа на 297% та 128% на 15-ту добу за розвитку опіку 1-го та 2-го ступеня відповідно. Вміст зазначеної фракції зростає протягом всього експерименту після моделювання опіку 2-го ступеня. Показані фракції можуть відповідати кератинам. Базальними кератиноцитами експресуються кератин 5 (58 кДа) та кератин 14 (50 кДа). Процес реепітелізації опікової рани супроводжується посиленою міграцією базальних кератиноцитів до дистальних ділянок епідермісу ушкоджених тканин та посиленням синтезом кератинів [17; 18]. Підвищення вмісту фракції 50 та 58 кДа на 15-ту добу експерименту, ймовірно, свідчить про активний процес епітелізації опікої травми.

Показана фракція 34 кДа, може відповідати фактору росту ендотелію судин (VEGF). VEGF належить до VEGF/PlGF суперродини, є глікопротеїном та володіє потужним мітогенним потенціалом для

клітин ендотелію судин, стимулює їх проліферацію, викликає міграцію ендотеліоцитів та розвиток нових кровоносних судин [18]. Результати досліджень показали, що у експериментальних тварин після моделювання хімічного опіку стравоходу 1-го ступеня підвищується вміст фракції 34 кДа на 1-шу, 7-му, 15-ту та 21-шу добу на 62%, 144%, 90% та 216% відповідно. За розвитку ЛОС 2-го ступеня вміст показаної фракції підвищувався на 89%, 66%, 234% та 208% відповідно. В післяопіковий період на етапі проліферації виробляється велика кількість факторів росту, які є стимуляторами ангіогенезу [20]. Тому перспективним є розділення та детальне дослідження білкових фракцій нижче 20 кДа, які на електрофореграми відповідають факторам росту.

Також, нами було показано підвищення фракції 126 кДа на 140%, 303% та 10% на 7-му, 15-ту та 21-шу добу відповідно після моделювання 1-го ступеня ЛОС. За умов розвитку ЛОС 2-го ступеня вміст даної фракції підвищувався на 7-му добу на 164% та знижувався на 1-шу, 15-ту та 21-шу добу на 59%, 24% та 64% відповідно.



* – P<0,05 по відношенню до контролю

Рис. 1. Вміст bFGF в гомогенаті стравоходу за розвитку ЛОС 1-го та 2-го ступеня

Загальновідомо, що FGF (фактори росту фібробластів) – родина поліпептидів (від 17 до 34 кДа), які беруть участь в процесах ангіогенезу та загоєн-

Таблиця 1

Відносний вміст білкових фракцій у гомогенаті стравоходу щурів за розвитку ЛОС (1-ша ступінь (А) та 2-га ступінь (Б)), (мкг/мг білку) M±m, n=3

Білкові фракції м.м. (кДа)	контроль	1-ша доба	7-ма доба	15-та доба	21-ша доба
126	4,7 ± 0,19	2 ± 0,05*	11,5±1,6*	19,3±1,5*	5,3±0,6
90	0,8 ± 0,02	1,4 ± 0,06*	1,5±0,04*	1,0±0,04*	0,7±0,2
74	5,8 ± 0,12	11,3 ± 2,5*	8,8±0,44*	6,4±0,6	4,8±1,0
58	8,9 ± 0,33	2,6 ± 0,9*	2,5±0,12*	11,2±0,9*	10,0±0,5*
50	2,9 ± 0,11	2,8 ± 0,14	1,5±0,08*	11,5±1,0*	6,6±0,4*
34	3,7 ± 0,13	6,0±0,25*	9,05±0,34*	7,0±0,2*	11,7± 1,2*

*- P<0,05 по відношенню до контролю

Білкові фракції м.м. (кДа)	контроль	1-ша доба	7-ма доба	15-та доба	21-ша доба
126	4,7 ± 0,19	3±0,07*	12,65±2,1*	3,9±1,0	2,94±0,12*
90	0,8 ± 0,02	1,16±0,03*	1,7±0,6*	1,12±0,05*	1,01±0,19
74	5,8 ± 0,12	18,58±1,2*	8,7±0,4*	6,36±0,23*	4,11±0,15*
58	8,9 ± 0,33	4,25±0,2*	3,5±0,05*	16,3±0,8	7,3±1,2
50	2,9 ± 0,11	4,21±0,6*	3,6±0,6	7,38±0,2	5,14±0,4*
34	3,7 ± 0,13	7,01±0,6*	6,17±0,4*	12,38±1,3	11,42±0,9*

*-P<0,05 по відношенню до контролю

ня ран. Фактори росту фібробластів продукуються кератиноцитами, фібробластами, хондроцитами, ендотеліальними, гладком'язовими і тучними клітинами. Літературні дані щодо участі bFGF в процесі рубцювання або загоєння після опікових ран небагатовисвітлені [21]. Основна частина робіт присвячена впливу факторів росту на загоєння рани різного генезу [22; 23].

Нами було визначено вміст фактора росту фібробластів за розвитку ЛОС 1-го та 2-го ступеня. Показано підвищення вмісту bFGF на 1-шу, 15-ту та 21-шу доба на 29%, 135% та 180% за розвитку ЛОС 1-го ступеня відповідно. Після моделювання ЛОС 2-го ступеня вміст bFGF підвищувався на 21%, 129%, 213% та 188% на 1-шу, 7-му, 15-ту та 21-шу добу. Отримані дані узгоджуються з результатами інших дослідників. Так, Н. Song та співав. показали, що bFGF синтезуються в нормальній шкірі навколо

судин. При ушкодженні тканин синтез фактору росту підвищується ендотеліоцитами та фібробластами [23]. Підвищення bFGF протягом всього експерименту може свідчити про вагомий участь зазначеного фактору у розвитку (процесі загоєння після опікових ран) ЛОС 1-го та 2-го ступеня. Результати подальших досліджень участі факторів росту дозволить розкрити молекулярно-біологічні механізми розвитку загоєння після опікових ран стравоходу.

Висновки і пропозиції. Отже, нами було показано зміни вмісту білкових фракцій в гомогенаті стравоходу за розвитку ЛОС 1-го та 2-го ступеня. Таким чином, актуальним є майбутні дослідження та залучення нових методів дослідження для визначення білкових фракцій нижче 20кДа та вище 120 кДа для розуміння участі білків екстрацелюлярного матриксу та факторів росту у процесі загоєння та/або рубцювання після хімічних опіків стравоходу.

Список літератури:

1. Yong Han, Qing-Shu Cheng, Xiao-Fei Li, Xiao-Ping Wang. Surgical management of esophageal strictures after caustic burns: A 30 years of experience // *World J Gastroenterol.* – 2013. – № 10(9). – С. 2846-2849.
2. Turan C., Ozkan U., Ozokutan H., Ozdemir M., Okur H., Kucukaydin M. Corrosive injuries of the esophagus in newborns // *Pediatr Surg Int.* – 2000. – № 16(7). – С. 483-494.
3. Alonda C. Pollins, David B. Friedman and Lillian B. Nanney. Proteomic investigation of human burn wounds by 2D-difference gel electrophoresis and mass spectrometry // *J. Surg Res.* – 2007. – № 142(1). – С. 143-152.
4. Li Ma, Chengjun Gan, Yong Huang, Ying Wang, Gaoxing Luo, Jun Wu. Comparative proteomic analysis of extracellular matrix proteins secreted by hypertrophic scar with normal skin fibroblasts // *Burns & Trauma.* – 2014. – № 2(2). – P. 76-83
5. Раська Я.Б., Іщук Т.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу у щурів I-го ступеню // *Медична хімія.* – 2013. – № 15(4). – С. 116-120.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – 1970. – 227. – P. 680-685.
7. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* – 1976. – 72. – P. 248-254.
8. Charles N. Bertolami and Diana V. Messadi. The Role of Proteoglycans in Hard and Soft Tissue Repair // *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* – 1994. – № 5(4). – P. 311-337.
9. David A. Rodeberg, Joseph G. Meyer and George F. Babcock. Heat shock response: presence and effects in burn patient neutrophils // *Journal of Leukocyte Biology.* – 1999. – № 66(5). – P. 773-780.
10. Diao L., Li C., Sheng Z. The significance of the expression of the HSP70 and HSP90 in the intestinal mucosa in scalded rats during early postburn stage. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* – 2000. – 16. – P. 279-282.
11. Hatoko M., Hirai S., Tada H., Muramatsu T., Shirai T., Matsumoto H., Ohnishi T. HSP72 induction of systemic organs of rats after severe burn injury // *Eur J Plast Surg.* – 1997. – 20. – P. 136-140.
12. Ramakrishnan, Prathiba V., Sridhar Rao K., Jayaraman V., Babu M., Gupta P.D. Expression of keratin in post burn scars and keloids // *Annals of Burns and Fire Disasters.* – 1995 – № 8(4). – P. 6-9.
13. Kevin J. Bruen, Chris A. Campbell, Wesley G. Schooler, Suzan deSerres, Bruce A. Cairns et al. Randell, Real-Time Monitoring of Keratin 5 Expression during Burn Re-epithelialization // *Journal of Surgical Research.* – 2004. – 120. – P. 12-20.
14. Кузнецова О.М., Кушлинский Н.Е., Березов Т.Т. Фактор роста эндотелия сосудов: особенности секреции в костной ткани в норме и при патологии. *Биомедицинская химия.* – 2003. – № 49(4). – С. 360-373.
15. Jeschke M.G., Wolf S.E., DeRoy M.A., Jarrar D., and Herndon D.N. Recombinant Human Growth Hormone (rhGH) Downregulates Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Burns. *Journal of Surgical Research.* – 1998. – № 76(1). – P. 11-16.
16. Keisuke Okabe, Ruka Hayashi, Noriko Aramaki-Hattori, Yoshiaki Sakamoto, Kazuo Kishi. Wound Treatment Using Growth Factors // *Modern Plastic Surgery.* – 2013. – 3. – P. 108-112.
17. Sabine Werner and Richard Grose. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines // *Physiol Rev.* – 2003. – 83. – P. 835-870.
18. Nicole S Gibran, F. Frank Isih, David H. Heimbach, David Gordon. Basic Fibroblast Growth Factor in the early human burn wound // *Journal of Surgical Research.* – 1994. – 56. – P. 226-234.
19. Ryoji Tsuboi, Chog-Ming Shi, Chiyo Sato, George N Cox and Hideoki Ogawa Co-Administration of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein-1 Stimulates Wound Healing in Animal Models // *Journal of Investigative Dermatology.* – 1995. – 104. – P. 199-203.
20. Ю.К. Абаев. Заживление острых и хронических ран // *Военная Медицина.* – 2010. – № 2. – P. 106-110.
21. Crowther J.R. *The ELISA Guidebook.* Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001.
22. Sakineh Fallahi, Seyed M.V. Hosseini, Soghra Fallahi, Morteza Salimi, Ali Akbar Hesam, Seydeh Hamideh Hoseini. Extent of Injury of Gastrointestinal tract due to accidental ingestion of chemicals among children at Bandar Abbas Children Hospital 2009-2011 // *Life Science Journal.* – 2012. – № 9(4). – P. 2054-2058.
23. Савви С.А. Модифицированная классификация химического ожога пищевода и его последствий. *Клінічна хірургія.* – 2009. – 3. – С. 5-8.

Ищук Т.В., Раецкая Я.Б., Савчук А.Н.

Национальный научный центр «Институт биологии»
Киевского национального университета имени Тараса Шевченко

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ГОМОГЕНАТА ПИЩЕВОДА В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖОГА ПИЩЕВОДА КРЫС

Аннотация

За последние десятилетия отмечается стабильное увеличение числа химических ожогов пищевода. Рубцовые изменения пищевода, которые развиваются в результате ожога, остаются одной из наиболее сложных проблем. Несмотря на многочисленные исследования, недостаточно изучены вопросы заживления и процессов рубцевания на клеточном и молекулярном уровне. Нами было показано количественные изменения белкового состава в условиях развития щелочного ожога пищевода. Дальнейшее исследование процесса заживления может быть полезным для создания эффективных подходов для профилактики образования рубцовых изменений пищевода.

Ключевые слова: ожог пищевода, белковые фракции, электрофорез, факторы роста, щелочь.

Ishchuk T.V., Raietska Ya.B., Savchuk O.M.

National Scientific Center "Institute of Biology"
Taras Shevchenko National University of Kyiv

CHANGES OF ESOPHAGEAL HOMOGENATE PROTEIN COMPOSITION UNDER EXPERIMENTAL BURNS OF ESOPHAGUS IN RATS

Summary

The last decade is marked by a steady increase in the number of chemical burns of the esophagus. Cicatricial changes of esophagus developed as a result of the burn remain one of the most difficult problems. Despite numerous researches, issues of healing of cicatricial processes at the cellular and molecular level are insufficiently studied. We have shown quantitative changes in protein composition under conditions of alkali burns of the esophagus. Further study of the healing process can be useful to develop effective approaches to prevent the formation of scarring changes of the esophagus.

Keywords: esophageal burn, protein fraction, electrophoresis, growth factors, alkali.