

## Функціонування протеїназ у слизовій оболонці стравоходу після хімічних опіків

Т.В. Ішук, О.М. Савчук, Я.Б. Расцька, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка;  
e-mail: tanuka - 05@ukr.net

*Досліджували активність протеолітичних ферментів, участь металопротеїназ (ММП) та їх тканинних інгібіторів (ТІМП) за розвитку лужного опіку стравоходу 1-го та 2-го ступеня. Виявлено підвищення вмісту ТІМП у гомогенатах стравоходу після опікової травми (у середньому на 31-56% залежно від ступеня опіку). Показано зниження активності серинових протеїназ за умов опіку 1-го ступеня на 15-ту, 21-шу добу на 35 та 18% відповідно, а 2-го ступеня — на 54 та 50%. Встановлено зниження ММП при опіку 1-го ступеня на 15-ту та 21-шу добу на 30, 19% відповідно, за умов хімічного опіку 2-го ступеня на 15-ту та 21-шу добу на — 30 і 37%. Отримані результати вказують на розвиток рубцевих змін за умов лужного опіку стравоходу. Подальше дослідження участі ММП та ТІМП у процесі загоєння ран, є перспективним при створенні ефективних підходів для профілактики утворення післяопікових рубців стравоходу.*

*Ключові слова:* лужний опік стравоходу; металопротеїнази; тканинні інгібітори металопротеїназ.

### ВСТУП

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я відзначається стабільне зростання числа хімічних опіків стравоходу, що корелює зі збільшенням кількості порівняно доступних технічних і побутових агресивних рідин [1]. Згідно зі статистикою основною групою ризику є діти від 1 до 3 років [2].

До ранніх наслідків хімічних опіків стравоходу належать набряк гортані, екзотермічний шок, кровотеча, некрози [3]. Проте основним результатом опікових уражень є формування рубців. Розвиток ранніх рубцевих змін починається вже з 3-го тижня після опікової травми [4]. Лише в 30% випадків загоєння ураження після хімічного опіку відбувається без рубцевих утворень, відповідно, у 70% пацієнтів формуються стійкі рубці [5]. Причиною розвитку рубцевих змін слизової шлунково-кишкового тракту є тривале та надмірне накопичення матриксних компонентів. Так, формування фіброзу (рубців) супроводжується накопиченням колагену та

морфологічними змінами тканини, що призводить до порушення балансу між процесами синтезу та деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Наразі відомо, що утворення рубців спричинено надмірним синтезом колагену та зміною співвідношення металопротеїназ (ММП) та їх тканинних інгібіторів (ТІМП) [6].

У динаміці загоєння післяопікових уражень клітинами секретуються, активуються та функціонують різні ММП. Зазначені ензими локалізуються в певних зонах ран, а їх активація припадає на різні періоди процесу загоєння [7]. Незважаючи на важливу роль, яку ММП відіграють у ремоделюванні позаклітинного матриксу, досліджень, присвячених вивченню протеолітичної активності протягом перших трьох тижнів (або ранніх рубцевих змін) післяопікових ран стравоходу недостатньо. Наукові праці з цієї проблематики, в основному, зосереджені на дослідженні або певних ММП, або їх інгібіторів тобто, не завжди комплексні [8].

© Т.В. Ішук, О.М. Савчук, Я.Б. Расцька, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко

Метою нашої роботи було визначення загальної активності протеолітичних ферментів та ролі ММП у загоєнні післяопікових ран за умов розвитку лужного опіку стравоходу 1-го та 2-го ступеня.

## МЕТОДИКА

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

Електрофорез ензимом проводили у 12%-му поліакриламідному гелі, який був заполімеризований з 1 мг/мл желатину. Після електрофорезу додецилсульфат натрію видаляли з гелю промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100. Потім гель залишали в 0,05 моль/л тріс-HCl-буфері (pH 7,4) упродовж 12 год. Гель забарвлювали за допомогою Coomassie R-250 та ідентифікували зони протеолітичної активності за положенням незабарвлених плям [10].

Загальну активність протеїназ у зразках аналізували за визначенням казеїнолітичної активності з наступними модифікаціями. Для селективного дослідження активності ММП і серинових протеїназ до реакційної суміші (кінцева концентрація) додавали 0,2 моль/л етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА) або 0,2 моль/л фенілметилсульфоніл флуориду (ФМСФ) відповідно [11].

Вміст ТІМП-1 та ММП-1, ММП-2 визначали методом імуноферментного аналізу

[12]. Як антиген при цьому використовували солюбілізований білковий матеріал гомогенату стравоходу щурів, розведений до концентрації білка 10 мкг/мл за допомогою 50 моль/л тріс-HCl-буфера (pH 7,4). Досліджувані зразки об'ємом 100 мкл інкубували в 96-луночковому планшеті протягом ночі при 4°C. Під час дослідження були використані первинні поліклональні антитіла («Santa Cruz», США), вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Bio-Rad», США) та субстрат о-фенілєндіамін перекису водню («Sigma», США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням програми OriginLab 8.0. та TotalLab 2.01. Зміни показників вважали вірогідними при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загоєння післяопікових ран є динамічним процесом і потребує балансу між механізмами синтезу та деградації компонентів ЕЦМ. Його можна розділити на три основні етапи: запалення, формування нової тканини (реепіталізація) та ремоделювання міжклітинного матриксу. Протеолітична деградація ЕЦМ є одним з ключових етапів загоєння опікових уражень (таких, як деградація матриксу, ангиогенез, міграція кератиноцитів і ремоделювання позаклітинного матриксу) та забезпечується протеолітичними ферментами [13].

Нами було визначено загальну протеолітичну активність гомогенату стравоходу за умов моделювання лужного опіку стравоходу (рис. 1). Так, на 1-шу добу експерименту показано підвищення активності протеолітичних ферментів за умов розвитку 1-го та 2-го ступеня опіку на 11 та 13% відповідно. Підвищення активності протеолітичних ферментів на 1-шу добу зумовлено пошкодженням клітин лугом і сприяє лізису некротизованих тканин для очищення опікової рани. Отримані результати узгоджуються з даними вітчизняних і закордонних дослід-

ників [14,15]. За умов моделювання лужного опіку 1-го ступеня на 7-му, 15-ту та 21-шу добу активність протеолітичних ферментів знижувалася на 23, 14 та 30% відповідно, 2-го ступеня — на 50 та 42% на 15-ту та 21-шу добу відповідно.

До основних протеїназ, які беруть участь у процесі ремоделювання післяопікових ран, належать серинові та ММП. Нами було визначено активність протеолітичних ферментів за наявності зазначених інгібіторів (рис.2). При розвитку хімічного опіку 1-го та 2-го ступеня на 1-шу добу активність ММП підвищувалась на 15 і 17%, на 15-ту та 21-шу добу відбувалось зниження на 30, 19% і на 30, 37% відповідно. Активність серинових протеїназ після моделювання опіку стравоходу 1-го ступеня підвищувалася на 1-шу добу на 30%, на 15-ту, 21-шу знижувалася на 35 та 18% відповідно. У разі опіку 2-го ступеня активність підвищувалася на 1-шу добу на 38%, на 15-ту, 21-шу — знижувалася на 54 та 50%.

Таким чином, лужний опік стравоходу 1-го та 2-го ступеня супроводжувався зниженням загальної протеолітичної активності, в тому числі активності ММП і серинових протеїназ. Опік 2-го ступеня характеризувався більш суттєвим змінами досліджуваних ферментів. Слід зазначити, що репараційні процеси за умов опіку стравоходу починаються з 10-15-

ї доби, тому зниження активності основних протеолітичних ферментів, які беруть участь у ремоделюванні ЕЦМ, можуть призводити до надмірного рубцювання опікової рани після опіку стравоходу 2-го ступеня.

Функціонування ММП при нормальних та патологічних загоєннях ран активно досліджується [16, 17]. Разом з цим недостатньо експериментальних та клінічних даних стосовно ролі ММП у загоєнні післяопікових ран саме стравоходу.

Нами було визначено вміст ММП-1 та ММП-2 у гомогенаті слизової оболонки стравоходу щурів після моделювання лужного опіку 1-го та 2-го ступеня (рис.3). Вміст ММП-1 зростає протягом усього експерименту, максимальне підвищення спостерігалось на 1-шу добу при опіку 1-го та 2-го ступеня на 287 та 217% відповідно порівняно з контрольними значеннями. Вміст ММП-2 у гомогенатах стравоходу вірогідно підвищувався. Так, за умов лужного опіку 1-го ступеня він підвищувався на 1-шу та 21-шу добу на 108 та 105% відповідно, при опіку 2-го ступеня — на 163 та 153%. Слід зазначити, що за умов моделювання лужного опіку стравоходу 2-го ступеня, вміст ММП-2 був вищим протягом всього дослідження, порівняно з опіком 1-го ступеня.

Після травми ММП-1 синтезується базальними кератиноцитами дистальних діля-

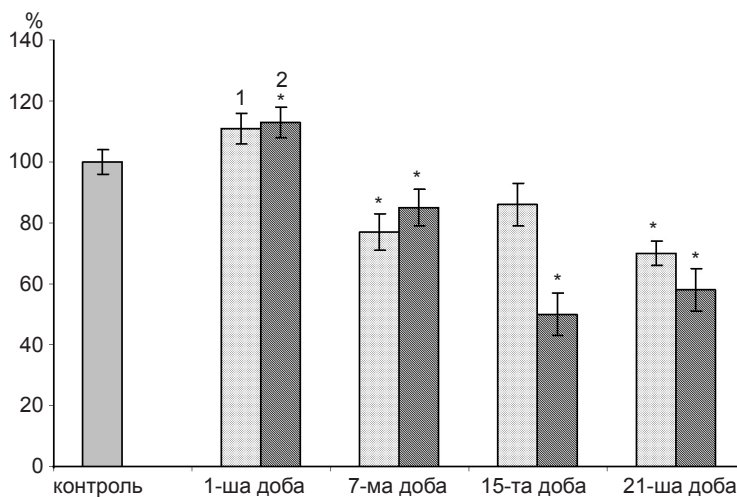


Рис. 1. Загальна протеолітична активність гомогенату стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го (1) та 2-го (2) ступеня. \*  $P < 0,05$  відносно контролю

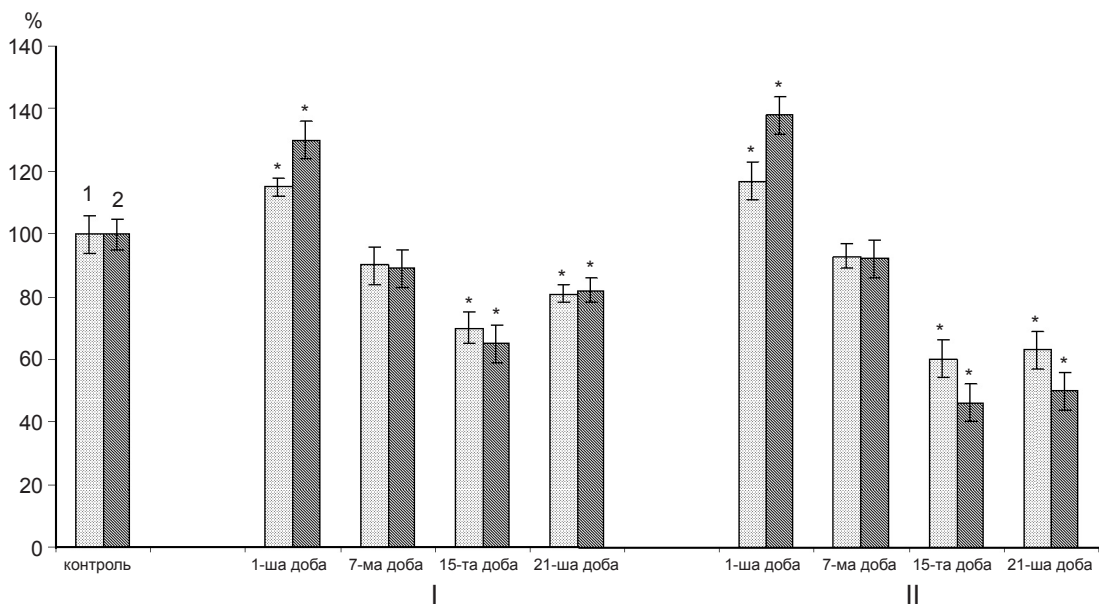


Рис. 2. Активність серинових протеїназ (I) та металопротеїназ (II) гомогенату стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го та 2-го ступеня. \* $P < 0,05$  відносно контролю

нок епідермісу декількох типів опікових уражень (ранової інфекційні рани, хронічні виразки, післяопікові рани) [13]. Окрім того, автори опублікували дані, що показали участь ММП-2 та ММП-3 у загоєнні післяопікових ранах [18,19]. Варто вказати, що вміст ММП-2 зростає протягом 1-2-ї доби після пошкодження шкіри та зберігається на до-

сить високому рівні навіть за умов повного загоєння рани [18].

Аналіз ензимограми гомогенату стравоходу контрольних зразків і таких після моделювання опіку 2-го ступеня виявив білкові фракції з молекулярними масами 75, 72, 57, 53 та 28 кДа. Білкова фракція з молекулярною масою 72 кДа, ймовірно, від-

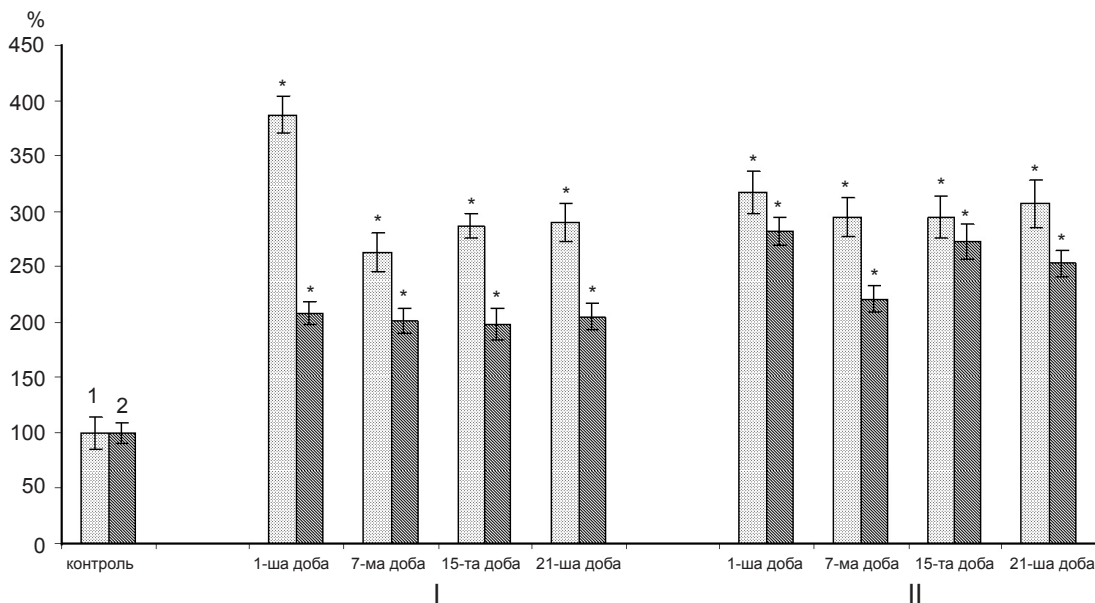


Рис. 3. Вміст мелопроїтеїнази-1 (I) та металопротеїнази-2 (II) у гомогенаті стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го та 2-го ступеня. \* $P < 0,05$  відносно контролю



повідас ММП-2. Фракція з молекулярною масою 57 кДа може відповідати ММП-3 (стромелізін-1), яка каталізує деградацію багатьох компонентів сполучної тканини, включаючи протеоглікани, колаген типів II, IV, IX і XI, ламінін і фібронектин. ММП-3 секретується, як профермент і активується в природних умовах через обмежений протеоліз тканинними і плазматичними ендопептидазами [18].

Білкова фракція з молекулярною масою 75 кДа, можливо відповідає ММП-8 (також відома, як нейтрофільна колагеназа). Цей фермент міститься в специфічних гранулах поліморфноядерних лейкоцитів (PMNs) у вигляді неактивного проферменту. ММП-8 – ключовий фермент початкових етапів процесів руйнування ЕЦМ, особливо при патологічних запальних процесах. Benedict та співавт. встановили, що його вміст в уражених ділянках шкіри підвищується на 4-ту добу ранового процесу більше ніж у 2 рази порівняно з ММП-1 [20], що пов'язано з особливостями профілів синтезу ММП-8. У перші години після пошкодження шкіри нейтрофіли починають інфільтрувати тканини рани, що триває впродовж усієї стадії запалення. Як відомо, ці клітини продукують численні цитокіни та білкові фактори, у тому

числі і деякі протеїнази, зокрема ММП-8 [17].

Виявлена білкова фракція з молекулярною масою 53 кДа може відповідати ММП-10, або стромеліназі-2, яка здатна розщеплювати кілька білків, що беруть участь у ремоделюванні та загоєнні ран: колаген типів III і IV, желатин, нідоген, ламінін-1, еластин і протеоглікани. Активний фермент здатен активувати про-ММП-1, -7, -8 і -9. Фракція з молекулярною масою 28 кДа ймовірно відповідає ММП-7, однієї з найменших протеїназ, що складається з продому та каталітичного домену. ММП-7 синтезується в нормальних і стресованих епітеліальних клітинах [7].

Наразі відомо, що порушення процесу загоєння післяопікових ран (рубцювання) є причиною надмірного синтезу колагену, який спричинений дисбалансом у співвідношенні ММП та ТІМП [21]. Dietmar та співавт. показали збільшення експресії ТІМП-1 та ТІМП-2 в гіпертрофічній рубцевій тканині після опіків [17]. Очевидно, ТІМП також має велике значення для патогенезу ранового процесу.

Нами було визначено вміст інгібіторів ММП, ТІМП-1, в гомогенатах стравоходу після моделювання 1-го та 2-го ступеня

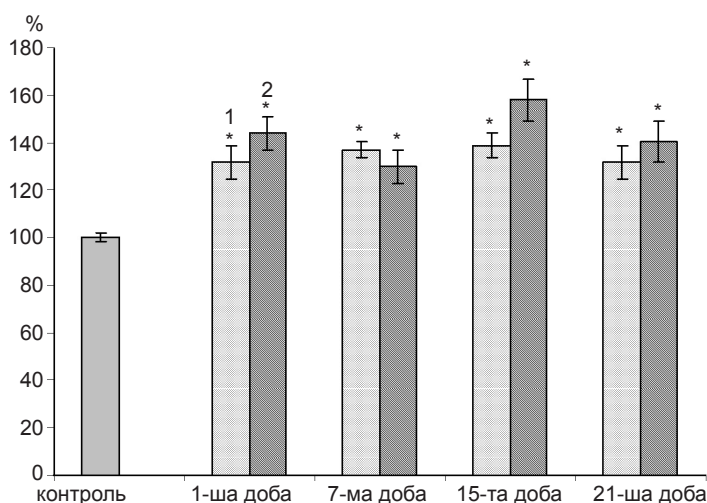


Рис. 4. Вміст тканинних інгібіторів металопротеїназ-1 у гомогенаті стравоходу за умов експериментального моделювання лужного опіку 1-го (1) та 2-го (2) ступеня. \*  $P < 0,05$  відносно контролю

лужного опіку (рис.4). Так, протягом усього експерименту цей показник вірогідно зростав порівняно з контролем. Найвище значення спостерігали на 15-ту та 21-шу добу після моделювання опіку стравоходу 2-го ступеня. Значне підвищення вмісту ТІМП-1 за умов опіку 2-го ступеня та зниження активності протеолітичних ферментів на 21-шу добу експерименту може свідчити про розвиток рубцевих змін.

Отже, лужний опік супроводжувався зниженням активності протеолітичних ферментів гомогенату стравоходу. Показано участь ММП у загоєнні післяопікових ран. Отримані результати, щодо підвищення вмісту ТІМП та зниження активності ММП гомогенату стравоходу свідчать про розвиток рубцевих змін за умов моделювання лужного опіку 2-го ступеня.

**T.V. Ishchuk, O. M Savchuk, Ya.B. Raetska,  
V.V. Vereschaka, L.I. Ostapchenko**

## **FUNCTIONING PROTEASES IN THE ESOPHAGUS MUCOSA AFTER CHEMICAL BURNS**

The main result of esophagus burn is the formation of scars, that caused by excessive synthesis of collagen and changes the balance of metalloproteinases and their tissue inhibitors. It was studied the activity of proteolytic enzymes, participation of MMP (metalloproteinase) and their tissue inhibitors (TIMP) in alkali burns of the esophagus 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degrees. We have shown a significant increase of TIMP level in homogenate after alkali burns of the esophagus (an average of 31-56% depend on of burn degree). We observed a reduced activity of serine proteinase after 1<sup>st</sup> degree burns on 15<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> day 35 and 18% respectively, after burns 2<sup>nd</sup> degree on 15<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> day 54 and 50%. The decrease of activity MMP after 1<sup>st</sup> degree burns on 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day 30, 19%, respectively, in conditions of chemical burns 2<sup>nd</sup> degree on 15<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day 30, 37%. These data may indicate the development of scarring after burn simulation of 2<sup>nd</sup> degree. Further investigation of the MMP and TIMP in the process of wound healing can be useful in creating effective approaches to prevent formation of post scarring of the esophagus.

Keywords: caustic burns of the esophagus; matrix metalloproteinases; tissue inhibitor of metalloproteinases.

*Educational and Scientific Centre «Institute of Biology»,  
Taras Shevchenko National University of Kyiv.*

**Т.В. Ищук, А.Н. Савчук, Я.Б. Раецкая,  
В.В. Верещака, Л.И. Остапченко**

## **ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРОТЕИНАЗ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПИЩЕВОДА ПОСЛЕ ХИМИЧЕСКОГО ОЖОГА**

Исследовали активность протеолитических ферментов, участие металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТІМП) в условиях развития щелочного ожога пищевода 1 и 2-й степени. Выявлено повышение содержания ТІМП в гомогенатах пищевода после ожоговой травмы (в среднем на 31-56% в зависимости от степени ожога). Показано снижение активности сериновых протеиназ при ожоге 1-й степени на 15-е, 21-е сутки на 35 и 18% соответственно, а при 2-й степени - на 54 и 50%. Установлено снижение активности ММП при ожоге 1-й степени на 15-е и 21-е сутки на 30, 19% соответственно, в условиях развития ожога 2-й степени на 15-е и 21-е сутки на 30 и 37%. Полученные результаты указывают на развитие рубцовых изменений после моделирования ожога пищевода. Дальнейшее исследование участия ММП и ТІМП в процессе заживления ран, является перспективным в создании эффективных подходов для профилактики образования послеожоговых рубцов пищевода.

Ключевые слова: щелочной ожог пищевода; металлопротеиназы; тканевые ингибиторы металлопротеиназ.

*УНЦ «Институт биологии», Киевского национального  
университета им. Тараса Шевченко.*

## **REFERENCES**

1. Yong H, Qing-Shu C, Xiao-Fei L, Xiao-Ping W. Surgical management of esophageal strictures after caustic burns: A 30 years of experience. *World J Gastroenterol.* 2013; 10 (9): 2846-49.
2. Kalkan Y, Tumkaya L, Akdogan R, Yucel A, Tomak Y, Sehitoglu I, Pergel A. A novel model approach for esophageal burns in rats: A comparison of three methods. *Toxicol Ind Health.* 2013;1-7.
3. Fallahi S, Hosseini S, Fallahi S, Salimi M, Akbar Hesam A, Hamideh Hoseini S. Extent of Injury of Gastrointestinal tract due to accidental ingestion of chemicals among children at Bandar Abbas Children Hospital 2009–2011. *Life Sci J.* 2012; 9(4): 2054-58.
4. Savvy S. A modified classification of chemical esophageal burn and its consequences. *Clin Surgery.* 2009; 3: 5-8 [Russian].
5. Boyko V, Kozin Y, Shevchenko A, Rajiv Kumar S, Novikov E, Klimenko V. Immunological disorders combined with post-burn strictures of the esophagus and stomach. *Med Today and Tomorrow.* 2009; 3–4: 92-5 [Russian].
6. Imaizumi R, Akasaka Y, Inomata N, Okada E, Ito K, Ishikawa Y, Maruyama Y. Promoted activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in keloid fibroblasts and increased expression of MMP-2 in collagen bundle regions:

- implications for mechanisms of keloid progression. *Histopathology*. 2009; 54(6): 722-30.
7. Gill S, Parks W. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(6-7): 1334-47.
  8. Bálint N, Livia S, Szilárd R, Csaba L, Barbara R, János L, Lajos B, Csaba C. Dynamic changes of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 after burn injury. *J Critical Care* 2015; 30 (1): 162-6.
  9. Raetska Y, Ischuk T, Dzhus O, Savchuk O, Ostapchenko L. Experimental modeling of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degrees alkali esophageal burn in immature rats. *Biological system*. 2014; 6(1): 39 -44 (Ukrainian).
  10. Savchuk O. The investigation of protein-protein interactions in hemostatic system using enzyme electroforesis method. *Med Chemistry*. 2010; 12(1): 60-7 [Ukrainian].
  11. Hummel BC. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can J Biochem and Physiol*. 1959; 37: 1393-99.
  12. Crowther JR, editor. *The ELISA guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 2001.
  13. McCarty S, Percival S. *Proteases and Delayed Wound Healing*. *Adv Wound Care*. 2013; 2(8): 438-47.
  14. Mirastschijski U, Zhou Z, Rollman O, Tryggvason K, Ågren M. Wound Healing in Membrane-Type-1 Matrix Metalloproteinase-Deficient Mice. *J Investigative Dermatology*. 2004; 123: 600-602.
  15. Protasov MV, Smagina LV, Yudintseva NM, Galibin OV, Pinaev GP. Possibility of predicting rat wound epithelization by changes in matrix metalloproteinases activities in wound exudates. *Cell and Tissue Biology*. 2009; 3 (3): 249-253 [ Russian].
  16. Dasu M, Spies M. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severely burned children. *Wound Rep Reg*. 2003; 11:177-80.
  17. Dietmar U, Franziska U, Frank U, Andrzej P, Norbert P. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010; 63: 1015-21.
  18. Frossing S, Rono B, Hald A, Romer J, Lund LR. Skin wound healing in MMP2-deficient and MMP2 / plasminogen double-deficient mice. *Exp Dermatol*. 2010; 19 (8): 234-40.
  19. Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K., Into T, Matsushita K. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol*. 2009; 175: 1905-14.
  20. Nwome B, Hui-Xiu L, Diegelmann R, Coner K. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Rep Reg*. 1998; 6: 127-36.
  21. Li Q, Guo S, Liu D, Feng S, Wei Q. Correlation of the expressions of MMPs-9, TIMP-1 and TIMP-2 with cesarean section scar. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012; 32 (9): 1336-40.

*Матеріал надійшов  
до редакції 25.03.2015*