

**Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

ПРИСЯЖНЮК АЛЬОНА ІГОРІВНА

УДК 616.34-002-02-092+616.833

**РОЛЬ ПЕРИФЕРИЧНОЇ ДОФАМІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ В ПАТОГЕНЕЗІ
ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ КИШЕЧНИКА**

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Толстанова Ганна Миколаївна,
Київський національний університет імені
Тараса Шевченка МОН України,
начальник Науково-дослідної частини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
завідуюча відділом нейрохімії

доктор медичних наук, професор
Дорофєєв Андрій Едуардович,
Національна медична академія
післядипломної освіти імені П.Л. Щупика,
професор кафедри терапії

Захист відбудеться «04» червня 2018 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12.

Автореферат розісланий «03» травня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24

Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Дофамін – це біогенний амін, загальновідомий як нейромодулятор центральної нервової системи, що бере участь у регуляції локомоторної, когнітивної функцій та системи винагороди [Iversen L.L., 2007]. Дофамін опосередковує свої ефекти через взаємодію з G-протеїн-зв'язаними дофаміновими рецепторами (ДР) - Д1-Д5 типу [van den Brink W.J., 2018].

Відомо, що 40% дофаміну має периферичне походження, включаючи шлунково-кишковий тракт (ШКТ) [Eisenhofer G., 1997]. Чисельні дослідження на симпатомованих та нокаутуваних тваринах показали наявність тирозинової гідроксилази (фермент, що лімітує синтез дофаміну) в не-нейрональних клітинах (епітеліальних, м'язевих, ендотеліальних та лейкоцитах) [Eisenhofer G., 1997; Eaker E.Y., 1988]. Більш того, доведено важливу роль кишкової мікробіоти в синтезі біологічно-активного дофаміну [Lyte M., 2013, 2014]. В останні роки з'являється все більше повідомлень про регуляторну роль периферичного дофаміну, зокрема в забезпеченні імунної відповіді та нейро-імунної взаємодії; регуляції кров'яного тиску; рівня та метаболізму глюкози; підтримці ендотеліального бар'єру, пригніченні розвитку патологічного ангиогенезу [Basu S., 2004; Chakroborty D., 2011; Gomez R., 2006; Mackie P., 2018; Pacheco R., 2013].

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належить неспецифічний виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона (ХК), характеризуються хронічними виразками та запаленням стінки кишечника, мають прогресуючий і деструктивний перебіг і, отже, можуть спричиняти різні ускладнення, включаючи стенози, абсцеси, свищі, позакишкові прояви та підвищують ризик колоректального канцерогенезу. ЗЗК можуть виникати в будь-якому віці, більше ніж 50% хворих знаходиться в працездатному віці. Сучасні терапевтичні підходи (пр. інфліксимаб, ведолізумаб) [Neurath M., 2017] по-перше не призводять до тривалої ремісії, більш того мають високу ціну і тому є недоступними для більшості українських пацієнтів. Зважаючи на те, що перебіг даної хвороби має рецидивуючий характер, що обумовлює витрати держави на лікарняні листки, а також те, що ЗЗК в ряді випадків стають причиною інвалідизації, пошук нових терапевтичних мішеней на основі більш глибокого розуміння патогенезу ЗЗК має не лише фундаментальне але і важливе соціально-економічне значення.

Перші спостереження про роль дофаміну, як чинника виразкоутворення гастродуоденальної зони, було зроблено в 1965 році на пацієнтах з хворобою Паркінсона (гіпофункція центральних дофамінергічних нейронів) [Strang R., 1965] і підтверджена, відсутність даного феномену у пацієнтів з шизофренією (гіперфункція дофамінергічної системи) [Szabo S., 1979]. Ці дані були підтриманні застосуванням селективних агоністів та антагоністів ДР на експериментальних моделях гастродуоденальних виразок [Szabo S., 2015].

Д1-Д5- ДР були знайдені по всій довжині ШКТ, з переважанням Д2- та Д3-ДР в товстій кишці [Zhang X.M., 2015]. У пацієнтів, хворих на ЗЗК [Magro F., 2002] та на моделі експериментального ВК у щурів [Magro F., 2004] встановлено зниження рівня L-3,4-дигідрофенілаланіну та дофаміну в слизовій оболонці товстої кишки. На T-bet(-/-) та Rag2(-/-) мишачих моделях коліту було показано

значне зниження дофаміну фекалій в гострий період хвороби [Rooks M.G., 2014] Більше того, поліморфізм ТаqIA Д2-ДР, що відповідає за зниження щільності рецепторів, асоційований з рефракторною ХК [Magro F., 2006]. Наведене вище, свідчить про перспективність дослідження ролі периферичного дофамінергічного сигналіngu в патогенезі ЗЗК, як мішені для лікування даної патології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетних тем "Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій" (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.), "Дофамінергічна система в патогенезі запальних захворювань кишечника: клініко-експериментальні дослідження" (№ д/р – 0115U0002601, 2015 р.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.). Тема дисертації затверджена вченою радою ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №8 від 23 березня 2015 року).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчити стан периферичної дофамінергічної системи та роль Д2- і Д3-ДР в патогенезі ЗЗК.

Відповідно до мети було визначено наступні завдання:

1. Встановити рівень протеїнів, що беруть участь в метаболізмі дофаміну (тирозинова гідроксилаза (ТН), моноамінооксидаза-Б (МАО-Б)), а також дофаміновий транспортер (ДАТ), Д2- та Д3-ДР в слизовій оболонці товстої кишки (СОТК) щурів в нормі та за умов експериментального ВК.
2. Визначити рівень та локалізацію протеїнів ТН, ДАТ, Д2- та Д3-ДР в СОТК пацієнтів з неспецифічними ВК.
3. Дослідити біохімічні механізми перебігу експериментального ВК, опосередковані активацією Д2-ДР.
4. Дослідити біохімічні механізми перебігу експериментального ВК, опосередковані активацією Д3-ДР.
5. Визначити біохімічні та імунологічні показники лейкоцитів периферичної крові щурів при експериментальному ВК за умов руйнування периферичних дофамінергічних нейронів.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми патогенезу ЗЗК.

Предмет дослідження: периферичний дофамінергічний сигналінг.

Методи дослідження: біохімічні (колориметричне визначення концентрації глікопротеїнів, гексоз, гексозамінів, сіалових кислот та фукози, активність ферментів), молекулярно-біологічні (вестерн блот аналіз), імуногістохімічні, цитохімічні (ідентифікація тучних та келихоподібних клітин), гістологічні (морфометричний аналіз товстої кишки), фармакологічні методи (вплив агоністів та антагоністів Д2- і Д3-ДР, руйнування периферичних дофамінергічних нейронів) та методи варіаційної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено, що у щурів з експериментальним колітом порушений дофамін-опосередкований сигналінг в СОТК щурів, що обумовлено зниженням рівня ферментів ТН, МАО-Б, ДАТ і різнонаправленими змінами рівня Д2- та Д3-ДР. У біопсійному матеріалі товстої

кишки пацієнтів на неспецифічний ВК також показано зниження рівня протеїну TN, Д2- та Д3-ДР. Встановлено, що активація Д2-ДР пригнічує ендотеліальну проникність СОТК щурів за умов експериментального ВК через залучення Src та Akt кінази. Цей ефект частково опосередковується через активацію центральних Д2-ДР і сприяє гоєнню експериментального ВК. Активація Д3-ДР справляє протективну дію за умов експериментального ВК, частково за рахунок збільшення концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу та підвищення функціонального резерву тучних клітин СОТК щурів та перитонеальних макрофагів. Показано, що порушення дофамінергічного сигналіну на периферії асоціюється зі змінами у респіраторній активності та імунологічному профілі гранулоцитів та моноцитів крові в нормі та за умов експериментального ВК.

Практичне значення одержаних результатів. Доведено, що застосування препаратів з дофамінергічною активністю, а саме агоністів Д2- та Д3-ДР, є ефективним в прискоренні гоєння уражень при експериментальному ВК і може бути рекомендованим для подальшого клінічного випробування.

Особистий внесок здобувача. Інформаційний пошук, проведення експерименту та аналіз результатів дослідження виконані дисертантом особисто. Формування ідеї роботи, планування та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів проведено за участю наукового керівника ст.н.с., д.б.н. Толстанової Г.М. Допомогу в проведенні молекулярно-біологічних досліджень надавала м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М., імуногістохімічних – м.н.с., к.б.н. Дзюбенко Н.В., цитохімічних – доц, к.б.н. Варенюк І.М., імунологічних - асистент, к.б.н. Рудик М., робіт из тваринами - м.н.с, к.б.н. Довбинчук Т.В., що відображається у спільних публікаціях. Парафінові блоки архівного біопсійного матеріалу для імуногістохімічних досліджень були надані лікарем-проктологом, к.м.н. Керничним В.В., в рамках сумісної роботи над проектом "Дофамінергічна система в патогенезі запальних захворювань кишечника: клініко-експериментальні дослідження" (№ д/р – 0115U0002601, 2015 р.), що відображено в заключному звіті та спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: Європейському гастроентерологічному тижні UEGW-2017 (Барселона, Іспанія); XI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених "Актуальні питання клінічної медицини" (Запоріжжя, Україна, 2017); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь і поступ" (Львів, Україна, 2017); 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Генуя, Італія, 2017); «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century» (Київ, Україна, 2016); «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Міжнародна наукова конференція-конкурс молодих вчених» (Київ, Україна, 2016); «9th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection» (Краків, Польща, 2016); «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» (Київ, Україна, 2016); міжнародній літній школі «Perspectives for young scientists in life sciences: mastering global challenges of the modern society» (Івано-Франківськ, Україна,

2016); міжнародній конференції «Experimental Biology» (Бостон, США, 2015); «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015» (Київ, Україна, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових робіт, що відображають основний зміст дисертаційної роботи: 5 статей у фахових періодичних наукових виданнях, затверджених МОН України, 10 тез у матеріалах міжнародних та всеукраїнських конгресів, конференцій, з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу й узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел, що включає 214 джерел. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 185 сторінках (з яких основна частина займає 156 сторінок), ілюстрована 1 таблицею та 39 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені на білих нелінійних щурах-самцях, масою 160-180 г (n=261), які утримувались за стандартних умов акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Дослідження відповідають основним вимогам Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») та погоджені біоетичною комісією ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол №8 від 2.11.2015 р.

Стан дофамінергічної системи пацієнтів, хворих на неспецифічний ВК (n=5), та у контрольній групі (n=5) (краї резекції кишки з відсутністю пухлинного росту, видалені при хірургічному втручанні на пацієнтах з колоректальним раком) проводили на архівних біопсійних зразках завантажених у парафін. Зразки були отримані від пацієнтів, які проходили стаціонарне лікування в Хмельницькій обласній лікарні (лікар-проктолог, к.м.н. Керничний В.В.), відповідно до рішення комісії з питань біомедичної етики ВНМУ МОЗ України (м. Вінниця) від 27.03.2015 і на підставі письмової згоди пацієнтів щодо використання біопсійного матеріалу для медико-біологічних досліджень.

Експериментальний ВК у щурів викликали ректальним введенням 0,1 мл 6% йодоацетаміду (ЙА), розведеного в 1% розчині метилцелюлози (МЦ). Тваринам контрольної групи, відповідно, вводили 0,1 мл 1% розчину МЦ. Моніторинг клінічного стану тварин проводили щоденно та розраховували індекс активності хвороби. Щурів виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації через 0,5, 2, 6 год та 3, 7 і 14 днів від моменту моделювання ВК. Під час аутопсії видаляли 7 см товстої кишки від анального отвору, розрізали з антимезентерального боку, промивали в холодному натрій-фосфатному буфері, оцінювали макроскопічні показники перебігу ВК та брали зразки для молекулярно-біологічних чи гістологічних досліджень.

Для дослідження ролі периферичних дофамінергічних нейронів у розвитку експериментального ВК у щурів був обраний загальнозживаний метод

руйнування дофамінергічних нейронів, а саме 4-х разове (20 мг/кг, п/ш), через 2 год, введенням нейротоксину МРТР (*1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин*) (Sigma, USA) [Smeyne R., 2005]. Щурам контрольної групи підшкірно вводили 0,1 мл 0,9% NaCl (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»). Тварин виводили із експерименту шляхом декапітації на 18-й день експерименту.

Для дослідження ролі ДР, щурам вводили селективні: агоністи Д2-ДР (–)-квінпірол гідрохлорид (1 мг/100 г, п/о, 5 днів (Sigma, США)) та каберголін (1 чи 5 мкг/100 г, п/о, на 2 та 5-й день після введення ЙА (Pfizer, США)); периферичний антагоніст Д2-ДР домперідон (2 мг/100 г, п/о (Домрид, ТОВ «КУСУМ ФАРМ»); агоніст Д3-ДР (±)-7-гідрокси-N,N-ді-н-пропіл-2-амінотетралін (7-ОН-ДРАТ) (0,02 чи 0,1 мг/100 г, п/ш, 5 днів (Sigma, США)).

Морфометричний аналіз товстої кишки проводили на парафінових зрізах (3-5 мкм) забарвлених гематоксиліном-еозинном. Для цитохімічної ідентифікації тучних та келихоподібних клітин використовували набори толуїдинового та альціанового синього (ТОВ "БіоВитрум", Росія), відповідно.

Загальну концентрацію протеїнів у тотальному екстракті СОТК визначали за допомогою набору Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, США). Рівень протеїнів визначали методом Вестерн-блот з використанням специфічних первинних антитіл. Імуногістохімічним методом визначали рівень та локалізацію протеїнів в СОТК щурів з експериментальним ВК за допомогою системи візуалізації SaBC-методу, що заснований на комплексі стрептавідин-біотин-фермент [Boon M.E., 1990], та в СОТК пацієнтів з неспецифічним ВК – АВС-метод візуалізації, який заснований на комплексі авідин-біотин-фермент [Bratthauer G.L., 2010]. Для підтвердження специфічності антитіл як контроль застосовували імуноабсорбцію антитіл. В якості первинних антитіл застосовували: TH, MAO-B, Akt, phospho-Akt(Ser473), Src, phospho-Src(Tyr416), DAT, D2-R, D3-R (Santa Cruz Biotech, США).

Ендотеліальну проникність в СОТК визначали спектрофотометрично за рівнем екстравазації фарби Еванса (0,4 мг/100 г, в/в), яка формує комплекс з альбуміном [Radu M., 2013]. Епітеліальну проникність СОТК визначали за концентрацією флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC)-декстрану (Mr=3,0-5,0 кДа, Sigma, США) в плазмі крові, введеного перорально в дозі 20 мл/кг (22 мг/мл) [Yeon J.H., 2012].

Поверхневий слиз товстої кишки щурів відділяли від шару епітеліальних клітин за допомогою розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну [Komuro Y., 1991]. Відносний вміст глікопротеїнів слизу визначали за допомогою Шиф-реакції на PVDF-мембрані, яка базується на виявленні вуглеводного компоненту глікопротеїнів слизу шляхом окиснення спиртових груп, що перетворюються на альдегідні групи і візуалізуються завдяки кольоровій реакції з ШИФ-реагентом [Akiba Y., 2000], концентрацію – за реакцією з реактивом Фоліна після виділення глікопротеїнів слизу сульфосаліциловою кислотою та їх осадження фосфорно-вольфрамовою кислотою [Романенко Е.Г., 2012]. Концентрацію гексоз поверхневого слизу визначали за реакцією з орциновим реактивом [Колб В.Г., 1976], фукози – методом Діше-Шеттлз [Dishe Z., 1948], гексозамінів – за реакцією з

ацетилацетоном у лужному середовищі [Романенко Е.Г., 2013], сілових кислот – методом Гесса [Hess H.H., 1964].

Активність мієлопероксидази (МПО) визначали спектрофотометрично за реакцією з перекисом водню [Castaneda F.E., 2005]. Як стандарт використовували МПО (Sigma, Німеччина) в розчині гексадецилметиламонію броміду (НТАВ) в концентраціях, що відповідають активності 0,5 U/мл, 0,25 U/мл, 0,125 U/мл, 0,06 U/мл, 0,03 U/мл, 0,015 U/мл. Одну одиницю активності МПО визначали числом деградованого перекису водню у концентрації 1 μ моль/хв при $T=25^{\circ}\text{C}$. Активність МПО розраховували на г тканини досліджуваного зразку, дані представляли у вигляді – активність МПО U/г.

Мононуклеарні фагоцити перитонеального ексудату щурів отримували за методом, описаним Pietrangeli [Pietrangeli C.E., 2001]. Функціональну активність макрофагів визначали НСТ-тестом. Рівні АФК вимірювали за допомогою 2'7'-дихлородигідро-флуоресцин діацетату (H2DCFDA, Invitrogen) [Shapiro H., 2011]. Фагоцитарну активність та профіль лейкоцитів визначали на проточному цитометрі [Shapiro H., 2011].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0. Для оцінки кількісних показників визначали середнє значення (M) та стандартне відхилення (SD). Для всіх наявних вибірок перевірена гіпотеза нормальності розподілу за методом Шапіро-Уїлка. Показник вірогідності розраховували за допомогою t-критерію Стьюдента для вибірок з нормальним розподілом або на основі рангового непараметричного критерію Манна-Уїтні для ненормально розподілених вибірок. Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (p) приймався рівним 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення

Стан периферичної дофамінергічної системи в патогенезі ВК.

Активність дофамінергічного сигналіну залежить від співвідношення між рівнем синтезу та інактивації дофаміну [Beaulieu J.M., 2015]. TH – є ключовим ферментом, що лімітує синтез дофаміну із тирозину. Встановлено, що за розвитку експериментального ВК, спостерігались динамічні зміни у рівні протеїну TH в СОТК щурів, зокрема: його підвищення через 0,5 год (в 1,4 разів), з подальшим зниженням - через 2, 6 год (в 1,8 разів), 7 (в 2 рази) та 14 днів (в 3,3 разів) після введення ЙА ($p<0,05$) (рис. 1А). Фермент MAO-B забезпечує деградацію дофаміну та має вищу субстратну специфічність до нього в порівнянні з MAO-A та катехоламініотрансферазою. Ми спостерігали аналогічні до TH зміни в рівні протеїну MAO-B в СОТК щурів в різні терміни ЙА-викликаного ВК (рис. 1Б).

Окрім деградації, інактивація активності дофаміну обумовлена його зворотним захватом ДАТ. На моделі ДАТ-нокаутованих мишей встановлено потенційовання ефекту ендогенного дофаміну на моторику товстої кишки [Walker Z., 2000]. Нами показано, що за нормальних умов ДАТ локалізований по всій поверхні крипти епітеліоцитів, на ендотеліоцитах, а також на ентеральних нейронах СОТК щурів (рис. 1Г). За умов експериментального ВК спостерігалася зниження рівня протеїну ДАТ, що супроводжувалось зміною локалізації ДАТ до апікальної частини епітелію товстої кишки (рис. 1В, Г).

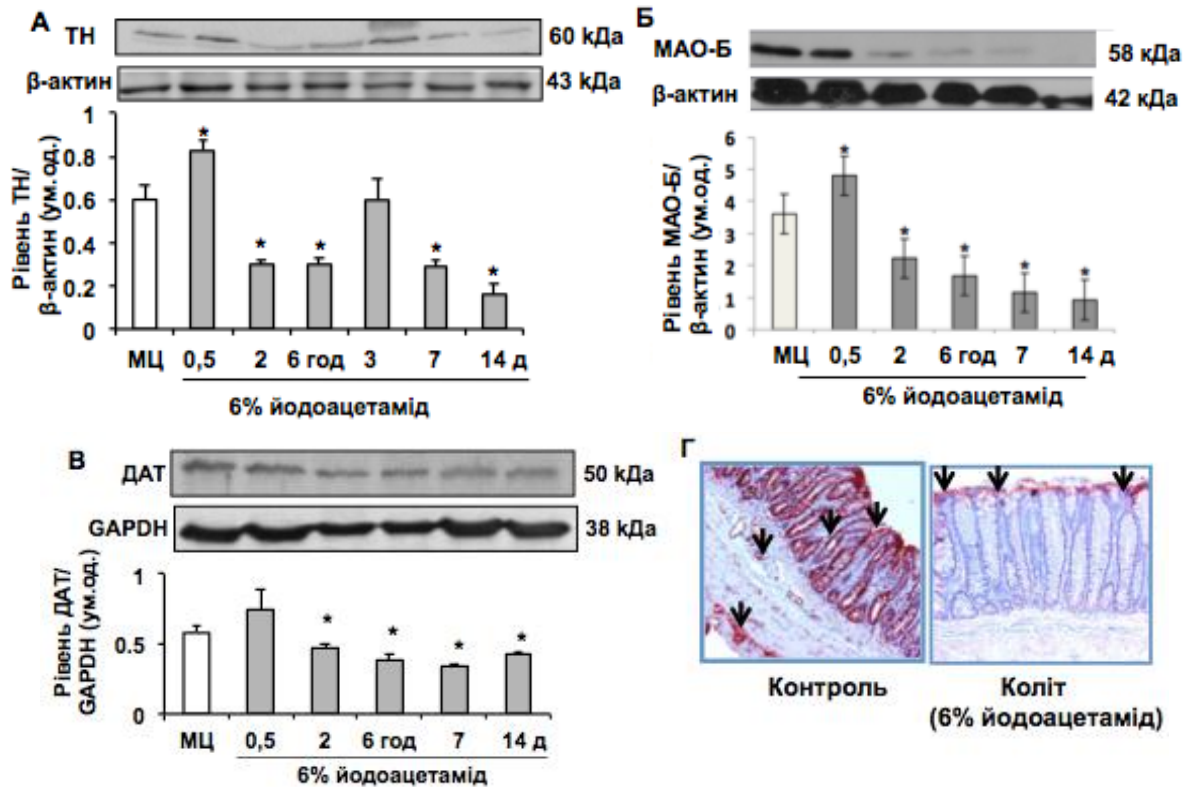


Рис. 1. Рівень протеїнів ТН (А), МАО-Б (Б) та ДАТ (В, Г) в СОТК щурів в контролі (МЦ) та через 0,5, 2, 6 год, 7 і 14 днів після моделювання коліту 6% ЙА. А,Б,В – Вестерн блот; Г - імуногістохімія, $\times 40$, стрілками вказана локалізація ДАТ. $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$ відносно МЦ.

Свою дію дофамін опосередковує через взаємодію з 5-ма типами ДР. За даними [Li Z.S., 2006], в кишечнику експресуються переважно Д2- та Д3-ДР, причому Д2-ДР локалізовані на ентеральних нейронах, тоді як Д3-ДР також і в слизовій оболонці. В наших дослідженнях рівень протеїну Д2-ДР в СОТК щурів підвищувався у 2,9; 2,8; 2,5 та 3 рази ($p < 0,001$), відповідно, через 2, 6 год, 7 та 14 днів після введення ЙА (рис. 2А). Рівень протеїну Д3-ДР, навпаки, зменшувався, починаючи з 2 год після введення ЙА у 1,6 рази ($p < 0,05$), через 6 год - у 1,7 рази ($p < 0,05$), 3 дні - у 1,3 рази ($p < 0,05$), поступово повертаючись до контрольних показників з 7-го дня (рис. 2Б). Імуногістохімічні дослідження показали, що при експериментальному коліті локалізації Д3-ДР має переважно епітеліальну локалізацію, тоді як в нормі Д3-ДР локалізуються на ендо- та епітеліальних клітинах і ентеральних нейронах товстої кишки (рис. 2В).

В дослідженнях на моделі Д2-ДР нокаутуваних мишей встановлено зворотній взаємозв'язок між рівнем протеїну Д2-ДР та рівнями ТН і ДАТ, що є характерним саме для даного типу рецептора і не спостерігалось на моделі Д3-ДР нокаутуваних мишей [Li Z. S., 2006]. Відповідно, отримані нами дані свідчать про патологічні зміни дофамінергічного сигналіngu в товстій кишці щурів за експериментального ВК.

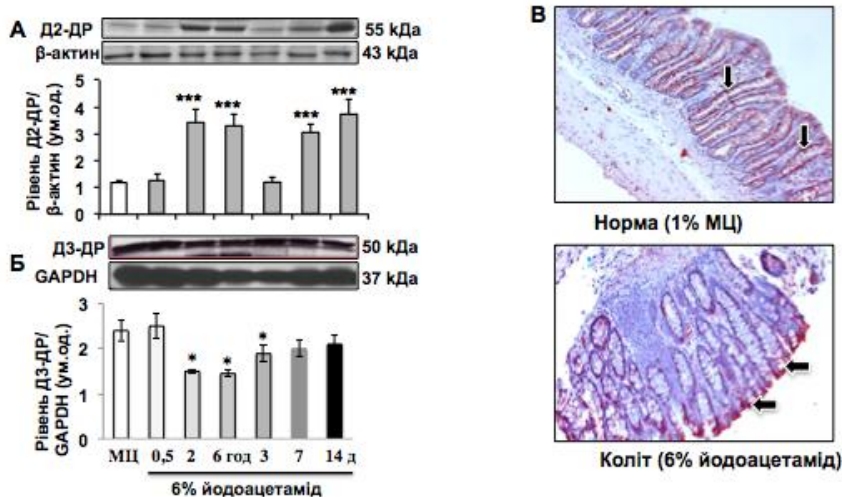


Рис. 2. Рівень Д2-ДР (А) та Д3-ДР (Б, В) в СОТК щурів в контролі (МЦ) та через 0,5, 2, 6 год, 7 і 14 днів після моделювання коліту введенням 6% ЙА. А, Б - Вестерн блот, В - імуногістохімія, $\times 40$, стрілками вказана локалізація Д3-ДР. $M \pm SD$, $n=21$. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ відносно МЦ.

Для підтвердження клінічної релевантності отриманих даних, ми перевірили стан периферичної дофамінергічної системи у пацієнтів з неспецифічним ВК (рис. 3). У здоровій СОТК позитивна імунореактивність на ТН, ДАТ, Д2- та Д3-ДР була виявлена на апікальній мембрані колоноцитів та базальній мембрані келихоподібних клітин. У пацієнтів з неспецифічним ВК імунореактивність ТН була значно зменшена, переважно за рахунок колоноцитів. Загальне зменшення імунореактивності на Д2- та Д3-ДР було характерною рисою запаленої слизової. Рівень та локалізація ДАТ достовірно не відрізнялася в нормі та патології.

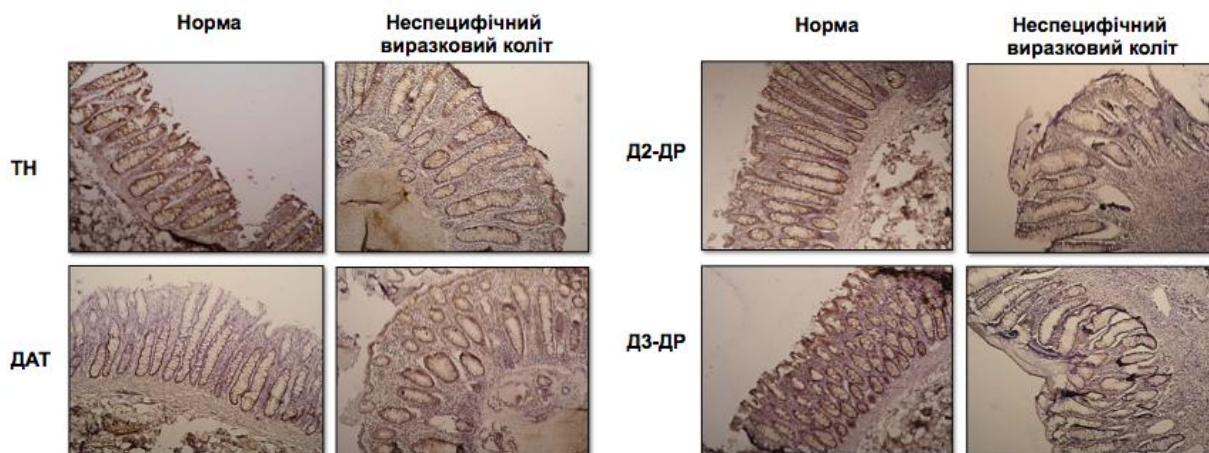


Рис. 3. Локалізація ТН, ДАТ, Д2-ДР та Д3-ДР (коричневий колір) в товстій кишці пацієнтів в нормі та з неспецифічним виразковим колітом (Імуногістохімія, $\times 10$).

Узагальнюючи отримані дані, можна зробити висновок про порушення метаболізму дофаміну і, відповідно, дофамінергічного сигналіngu, що опосередкований Д2- та Д3-ДР, за умов експериментального ВК у щурів та пацієнтів з неспецифічним ВК.

Біохімічні механізми перебігу експериментального коліту, опосередковані активацією Д2-ДР. Відповідно до сучасної концепції патогенезу ЗЗК, порушення кишкового бар'єру є ключовим патогенетичним фактором [Sun Z., 2016]. Підтримання кишкового бар'єру забезпечується інтегративною цілісністю епітеліального та ендотеліального бар'єрів [Taylor C.T., 2007]. На моделях гіперфункції яєчників [Gomez R., 2006] та канцерогенезу [Basu S., 2001, 2004; Ноеррнер L.H., 2015] встановлено, що активація Д2-ДР значно зменшує запалення через пригнічення VEGF/VEGF-R2 - опосередкованої ендотеліальної проникності та патологічного ангиогенезу. В наших дослідженнях активація Д2-ДР квінпіролом (1 мг/100 г, п/о) чи каберголіном (5 мкг/100 г, п/о) призводила до покращення морфологічних ознак ЙА-викликаного ВК у щурів. При цьому, активація Д2-ДР квінпіролом (1 мг/100 г, п/о) не впливала на рівень епітеліальної проникності СОТК щурів з ВК (рис. 4А), проте значно пригнічувала (в 1,4 рази $p=0,03$) рівень ендотеліальної проникності запаленої СОТК (рис. 4Б).

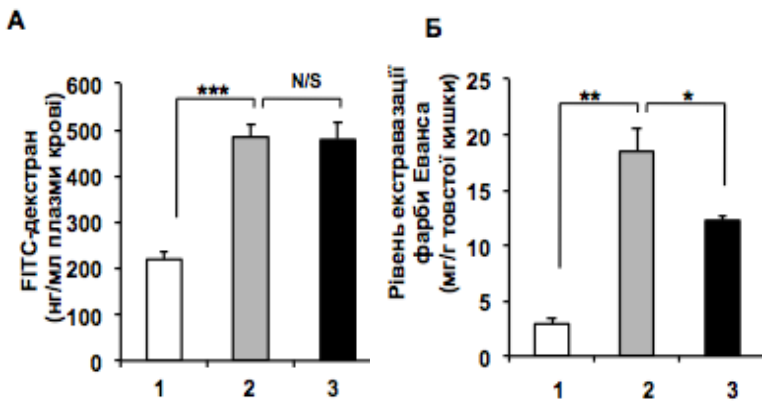


Рис. 4. Рівень проникності епітеліального (А) та ендотеліального (Б) шарів СОТК щурів за дії агоністу Д2-ДР квінпіролу за умов ЙА-викликаного коліту. $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. 1 – 1% МЦ + фіз. р-н. 2 – 6% ЙА + фіз. р-н. 3 – 6% ЙА + квінпірол (1 мг/100 г, п/о).

Для з'ясування механізму, за яким агоніст Д2-ДР знижує ендотеліальну проникність, ми перевірили залучення основних сигнальних молекул VEGF-опосередкованого контролю ендотеліальної проникності - pAkt та p-c-Src у перебігу ЙА-викликаного ВК. Src належить до класу тирозинових, а Akt - серин/треонінових протеїнкіназ [Roskoski R., 2005]. Нами було показано, що активація Д2-ДР квінпіролом не впливала на рівень загальних протеїнів c-Src та Akt в СОТК щурів з ЙА-викликаним ВК, проте знижувала у 1,7 рази ($p < 0,05$) рівень p-c-Src та у 2,2 рази ($p < 0,05$) - p-Akt (рис. 5А, Б).

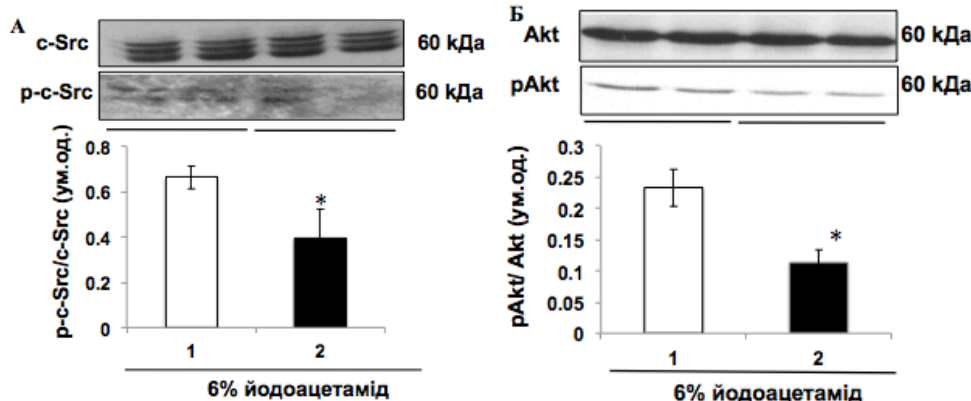


Рис. 5. Рівень c-Src (А) та Akt (Б) та їх фосфорильованих форм у СОТК щурів на тлі ЙА-викликаного коліту. Вестерн блот аналіз, $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$ відносно (1). 1 - 6% ЙА + фіз. р-н 2 – 6% ЙА + квінпірол (1 мг/100 г, п/о).

Отже, в механізмах Д2-ДР-опосередкованого впливу на ендотеліальну проникність СОТК щурів за експериментального ВК, залучений c-Src та Akt сигнальні каскади.

Каберголін та квінпірол проникають крізь гематоенцефалічний бар'єр і, відповідно, зафіксований нами позитивний ефект на перебіг ВК та рівень ендотеліальної проникності може бути обумовлений активацією Д2-ДР, як в центрі так і на периферії. В серії робіт [Glavin G.V., 1992, 1993, 1994, 1995] на моделях стрес- та етанол-викликаних виразках шлунку встановлена гастропротективна роль центрального та периферичного дофамінового сигналіngu. Для з'ясування ролі центральних та периферичних Д2-ДР в регуляції ендотеліальної проникності за умов ВК ми застосували селективний антагоніст периферичних Д2-ДР домперідон [Masci E., 2014]. За попереднього введення домперідону (2 мг/100 г, п/о) чи квінпіролу (1 мг/100 г, п/о) спостерігалось майже однакове пригнічення у 1,2 рази ($p < 0,05$) ендотеліальної проникності в СОТК щурів з експериментальним ВК у порівнянні з щурами яким вводили фіз. р-н. Сумісне введення домперідону та квінпіролу призводило до потенціювання ефекту (зниження у 1,5 рази, $p < 0,05$) у порівнянні з індивідуальними ефектами квінпіролу або домперідону (рис. 6).

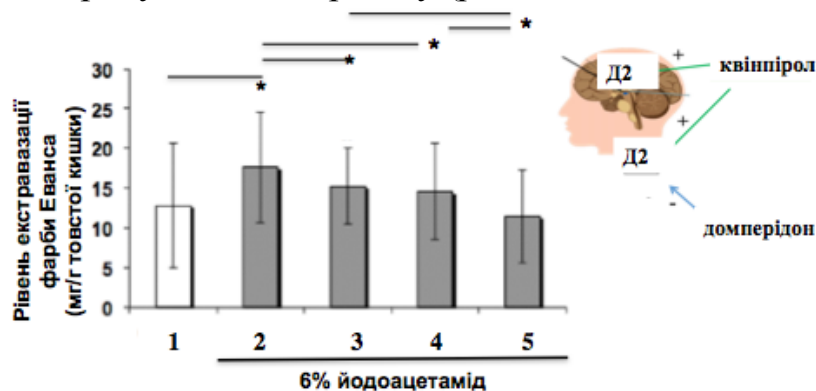


Рис. 6. Рівень ендотеліальної проникності СОТК щурів з ЙА-викликаним ВК за умов селективної блокади периферичних Д2-ДР. 1 – МЦ+фіз. р-н; 2 – фіз. р-н; 3 – домперідон (2 мг/100г); 4 – квінпірол (1 мг/100 г); 5 – домперідон + квінпірол. $M \pm SD$, $n=15$, $*-p < 0,05$

Отримані нами дані можуть свідчити про різнонаправлений ефект периферичних та центральних Д2-ДР на рівень ендотеліальної проникності СОТК при експериментальному ВК, з переважанням позитивного ефекту активації центральних Д2-ДР. На сьогоднішній день роль центральної дофамінергічної системи у розвитку та прогресуванні ЗЗК є недостатньо вивченою, однак, згідно з літературними даними, у пацієнтів з хворобою Паркінсона спостерігалось підвищення рівня прозапальних цитокінів та кишкової проникності, які є характерними ознаками ЗЗК [Devos D., 2013].

Біохімічні механізми перебігу експериментального коліту, опосередковані активацією Д3-ДР. Д2- та Д3-ДР дуже подібні за амінокислотною послідовністю, проте, як показано нами та іншими дослідниками [Glavin G.V., 1995, Li Z.S., 2006], вони мають різну локалізацію та відповідно можуть опосередковувати різні ефекти дофаміну. В наших дослідженнях введення високоселективного агоністу Д3-ДР 7-ОН-DPAT в низькій дозі (0,02 мг/100 г) значно покращувало морфологічні ознаки ЙА-викликаного ВК у щурів. Враховуючи той факт, що Д3-ДР були знайдені у великій кількості на келихоподібних клітинах, що продукують слиз (рис. 2В, 3), кількісний і якісний

склад якого є провідним захисним чинником в патогенезі ЗЗК [Johansson M.E., 2013], далі ми дослідили вміст глікопротеїнів та якісний склад олігосахаридних ланцюгів молекул глікопротеїнів поверхневого слизу СОТК щурів при експериментальному ВК та роль ДЗ-ДР в його підтриманні. Для визначення вмісту глікопротеїнів ми застосували два підходи, а саме ШИФ-реакцію за вуглеводною компонентою та реакцію Фоліна, що визначає білкову компоненту, після виділення сульфосаліциловою кислотою. Нами було показане достовірне у 1,8 разів ($p < 0,05$) підвищення відносного вмісту глікопротеїнів поверхневого слизу через 0,5 год після індукції ВК, яке супроводжувалося різким зниженням у 7 разів ($p < 0,05$) продукції слизу через 2 год та у 2,8 разів ($p < 0,05$) через 3 дні після індукції ВК. Через 7 днів відносний вміст глікопротеїнів підвищувався у 2 рази ($p < 0,05$) відносно контролю (рис. 7А). Цікаво, що динаміка змін рівня глікопротеїнів за білковою складовою (реакція Фоліна) мала трохи іншу картину. Зокрема в перші години після індукування коліту (0,5-2 год) не спостерігалось змін, але починаючи з 6-ї години концентрація зростала у 1,7 разів ($p < 0,05$) і трималась на плато на 3-й (збільшення у 2 рази, $p < 0,05$) та 7-й день експерименту (збільшення у 1,8 разів, $p < 0,05$) (рис. 7Б).

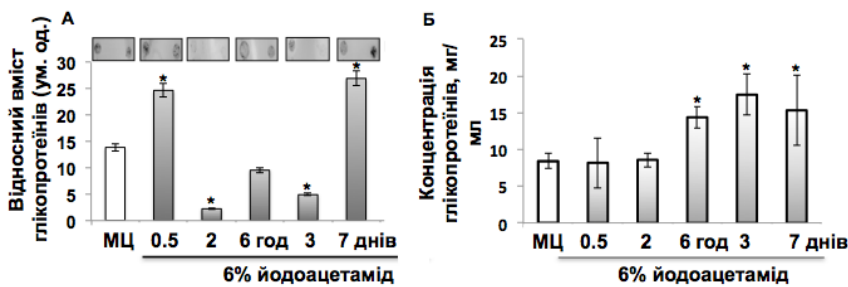


Рис. 7. Вміст глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни ЙА-індукованого коліту ($M \pm SD$, $n=24$), * - $p < 0,05$ відносно МЦ. А - ШИФ-реакція на PVDF-мембрані, Б - реакція Фоліна.

Отримані дані можна пояснити захисною реакцією СОТК за гострої фази ВК (0,5 год), що проявляється у підвищенні вивільнення вмісту келихоподібних клітин у відповідь на алькілюючий агент ЙА, та наступним поступовим відновленням шару слизу за рахунок секреції глікопротеїнів, але скоріше за все з порушенням якісним складом олігосахаридної частини молекул глікопротеїнів.

З метою дослідження якісного складу олігосахаридної частини молекул глікопротеїнів слизу, що відповідають за в'язкість слизу та ефективність слизового шару [Campbell V.J., 2001; Johansson M.E., 2014], ми вивчали концентрацію гексозамінів, сіалових кислот, гексоз та фукози у складі слизу товстої кишки щурів за гострої (0,5-6 год) та хронічної (7, 14 днів) стадії ЙА-викликаного ВК (рис. 8). Нами встановлено поступове збільшення концентрації гексозамінів, у 2,4-, 2,9-, 3,2- та 3,9-разів ($p < 0,05$), відповідно через 2, 6 год, та на 3-тю і 7-му добу після введення ЙА (рис. 8А). Аналогічно зростала концентрація сіалових кислот у 1,4 рази ($p < 0,05$) через 6 год, у 1,3 рази на 3-ю ($p < 0,05$) та у 1,7 разів ($p < 0,05$) на 7-му добу після введення ЙА (рис. 8Б). Значне збільшення

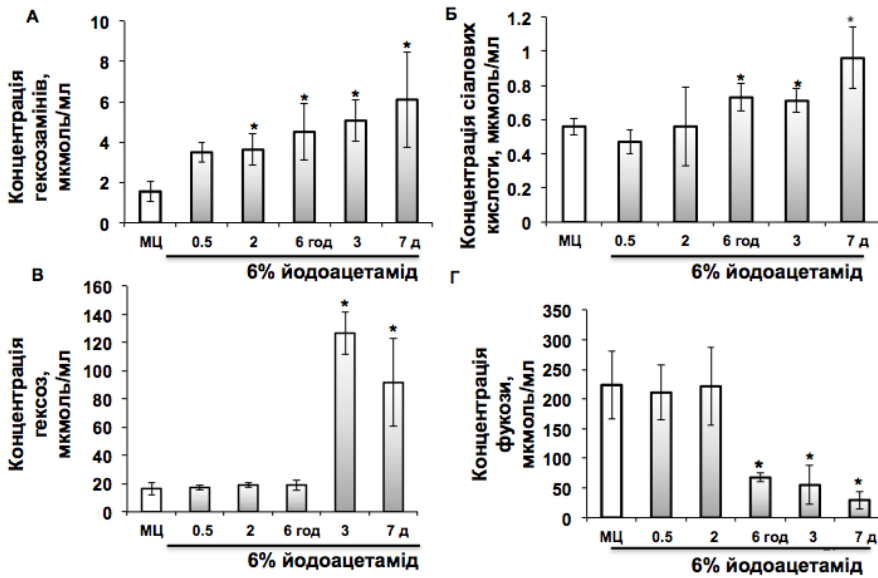


Рис. 8. Концентрація гексозамінів (А), сіалових кислот (Б), гексоз (В) та фукози (Д) поверхневого слизу товстої кишки щурів на фоні ЙА-індукованого коліту за різних термінів, $M \pm SD$, $n=24$. * - $p < 0,05$ відносно МЦ.

концентрації гексоз спостерігалось починаючи з 3-ї доби (у 7,7 разів, $p < 0,05$), на 7-му добу цей показник був у 5,5 разів ($p < 0,05$) вище в порівнянні з контролем (рис. 8В). Навпаки, концентрація фукози різко знижувалася вже через 6 год (у 3,3 рази, $p < 0,05$) після введення ЙА. Спостереження у більш віддалені терміни ВК (хронізація процесу запалення) виявили подальше зменшення концентрації фукоз у складі слизу. Так на 3-ю добу після початку експерименту їх кількість була зменшена у 4 рази ($p < 0,05$), на 7-му добу - у 7,5 разів ($p < 0,05$) (рис. 8Д).

Зростання кількості загальних глікопротеїнів поверхневого слизу збігалось у часі зі стрибкоподібним падінням вмісту фукози та зростанням концентрації сіалових кислот у складі вуглеводних ланцюгів муцинів. Це вказує на активацію процесів секреції муцинів із менш розгалуженою вуглеводною частиною. Незважаючи на зростання загальної кількості муцинів та значне подовження вуглеводних ланцюгів за рахунок зростання рівня гексоз, такий слиз стає менш щільним і за рахунок низького ступеня розгалуженості, ймовірно, гірше утримується на поверхні епітеліальних клітин [Karpelman M.D., 2008]. Крім того, зменшення кількості бічних вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів збільшує доступність епітелію для мікроорганізмів та чужорідних макромолекул, що, в свою чергу, підтримує хронічний перебіг запального процесу [Corfield A.P., 1992].

За умов активації ДЗ-ДР агоністом 7-ОН-ДРАТ ми спостерігали тенденцію до збільшення у 1,5 рази ($p = 0,08$) концентрації загальний глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів за умов ЙА-викликаного ВК (рис. 9А). Це збільшення корелювало з підвищенням у 1,3 рази ($p < 0,05$) концентрації гексоз, яка знижувалась у 1,2 рази ($p < 0,05$) за дії ЙА (рис. 9Б).

Келихоподібні клітини знаходяться у великій кількості у криптах СОТК і виділяють слиз. Ми дослідили стан келихоподібних клітин за умов ЙА-викликаного ВКта за введення 7-ОН-ДРАТ на фоні ВК. Нами було показано, що через 30 хв після індукції ВК товщина слизової оболонки зростала, мабуть, внаслідок набряку. Спостерігалось зниження площі перетину келихоподібних клітин у 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно контролю (рис. 9В).

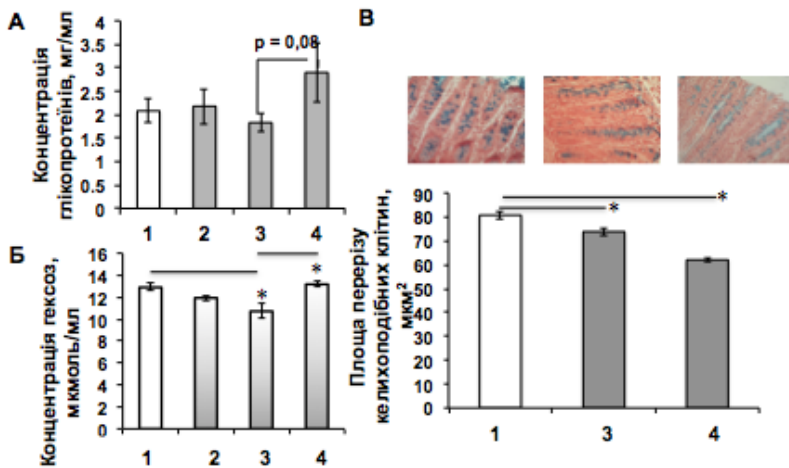


Рис. 9. Концентрація глікопротеїнів (А), гексоз (Б) та площа перерізу келихоподібних клітин (Б) поверхневого слизу товстої кишки щурів за введення агоніста ДЗ-ДР 7-ОН-ДРАТ за умов ЙА-викликаного коліту, $M \pm SD$, $n=12$. 1 – контроль (МЦ), 2 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100г, п.ш.), 3 – 6% ЙА, 4 – 7-ОН-ДРАТ + 6% ЙА. * - $p < 0,05$.

Введення агоніста 7-ОН-ДРАТ призводило до достовірного зниження площі перерізу келихоподібних клітин відносно контролю у 1,3 ($p < 0,05$) та відносно групи з ВК у 1,2 рази ($p < 0,05$). Це свідчить про те, що ефект активації ДЗ-ДР на продукцію поверхневого слизу скоріше за все пов'язаний зі стимулюванням його вивільнення келихоподібними клітинами. І не пов'язаний зі збільшенням секреторної функції келихоподібних клітин, адже їх площа перерізу зменшувалася за умов введення агоністу 7-ОН-ДРАТ.

В останні роки зростає кількість повідомлень про роль дофаміну, як імуномодулятора та зокрема його ролі у вродженій імунній відповіді [Pinoli M., 2017]. В дослідженнях на первинній культурі макрофагів людини було встановлено експресію ДЗ-ДР та Д4-ДР, а також ТН і ДАТ. Причому дофамін збільшував секрецію IL-6, CCL2, CXCL8 та IL-10 і знижував - TNF- α в макрофагах стимульованих ліпополісахаридом (LPS) [Gaskill P.J., 2012]. Нами показано, що функціональний резерв перитонеальних макрофагів, який складається з спонтанної та індукованої активності, був достовірно підвищеним у 1,6 рази ($p < 0,05$) у групі щурів, яким за 30 хв до моделювання ВК ЙА, вводили 7-ОН-ДРАТ (рис. 10А).

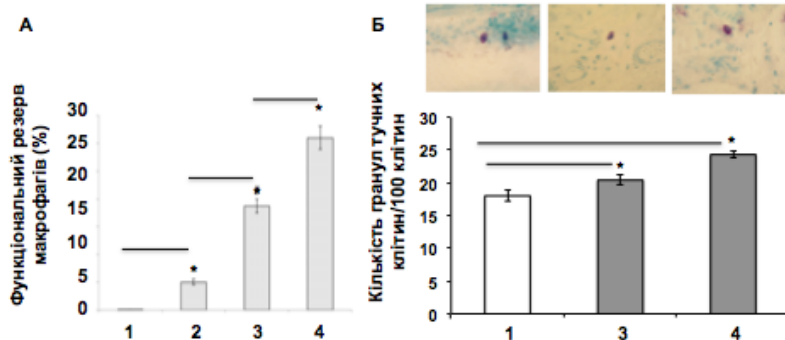


Рис. 10. Функціональний резерв макрофагів (А) та на кількість гранул тучних клітин (Б) СОТК щурів за введення агоніста ДЗ-ДР 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) за умов ЙА-індукованого коліту, $M \pm SD$, $n=18$. 1 – МЦ; 2 – 7-ОН-ДРАТ+МЦ; 3 – 6% ЙА; 4 – 7-ОН-ДРАТ + 6% ЙА. * - $p < 0,05$.

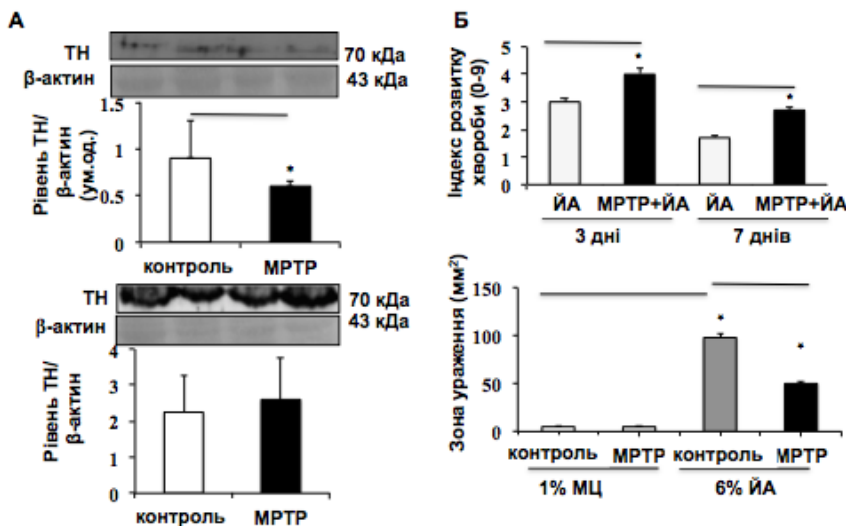
Тучні клітини є високоспеціалізованими імунними клітинами сполучної тканини хребетних тварин, які приймають участь у вродженому імунітеті і відіграють важливу роль у запальних реакціях. Було показано, що за введення 7-ОН-ДРАТ кількість гранул збільшувалася у 1,2 рази

($p < 0,05$) порівняно з контролем. За введення 7-ОН-DPAT за умов ЙА-індукованого ВК спостерігалось достовірне збільшення кількості гранул у 1,4 рази ($p < 0,05$) відносно контролю та у 1,2 рази ($p < 0,05$) відносно групи ВК (рис. 10Б).

Отже, за введення 7-ОН-DPAT збільшувався функціональний резерв макрофагів та тучних клітин.

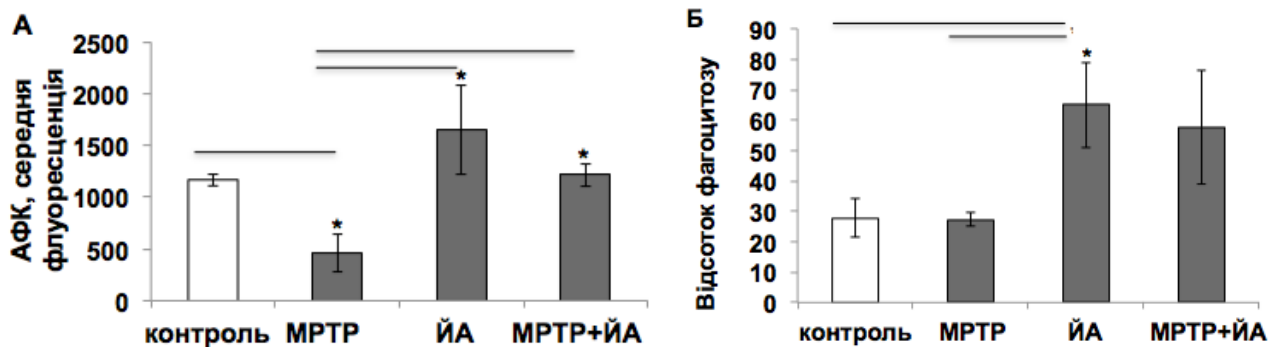
Імунологічні та біохімічні показники лейкоцитів периферичної крові щурів при експериментальному ВК за умов руйнування периферичних дофамінергічних нейронів. Враховуючи той факт, що в основі патогенезу ЗЗК лежить порушення імунної відповіді на нормобіоту [Beaulieu J.M., 2011], ми перевірили вплив периферичної дофамінергічної системи на біохімічні та імунологічні показники крові щурів з експериментальним колітом.

З цією метою, ми застосували метод фармакологічної деградації периферичної дофамінергічної системи введенням шурам нейротоксину МРТР. Згідно літературних джерел, МРТР в дозі 4 x 20 мг/кг не викликав достовірних змін у центральних дофамінергічних нейронах [Yamamoto S., 1999], але знижував число ентеральних ТН-позитивних нейронів, а також концентрацію дофаміну у тонкій кишці, стравоході та шлунку [Natale G., 2010]. Нами було показано, що у щурів яким вводили МРТР, рівні протеїну ТН були достовірно знижені у 1,5 рази ($p < 0,05$) в товстій кишці, але залишалися незмінними у мозку (рис. 11А), що підтверджує руйнування саме периферичних дофамінергічних нейронів. Важливо зауважити, що за руйнування периферичних дофамінергічних нейронів ми спостерігали значне покращення як клінічних (індекс розвитку хвороби), так і морфологічних показників (площа зони ураження товстої кишки) перебігу ЙА-коліту (рис. 11Б).



Для перевірки механізму, що лежить в основі покращення експериментального коліту за умов введення МРТР ми дослідили ключові параметри імунної відповіді. Показано, що руйнування периферичної дофамінергічної системи у щурів, яким вводили МРТР, було асоційованим з сильним зниженням у 2,5 рази ($p < 0,05$) продукції АФК циркулюючими моноцитами (рис. 12А), в той час, як активність фагоцитозу (рис. 12Б) і число

моноцитів у фагоцитозі залишалися незмінними у порівнянні з контрольними тваринами.



Більше того, продукція АФК циркулюючими моноцитами ($p < 0,05$) (рис. 12А) та
 Рис. 12. Біохімічні показники периферичних моноцитів крові щурів після введення нейротоксину МРТР на тлі ЙА-викликаного ВК: А – продукція внутрішньоклітинних АФК; Б – відсоток фагоцитозу; $M \pm SD$, $n = 16$. * - $p < 0,05$

число моноцитів у фагоцитозі (рис.12Б) було також знижено у щурів, яким вводили МРТР у порівнянні зі щурами, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК, але цей параметр не був підтверджений статистично для відсотка фагоцитозу. Отримані дані вказують на антизапальний профіль моноцитів, що може пояснювати менш виражені коліт-асоційовані ураження товстої кишки у щурів, яким вводили МРТР порівняно з щурами, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК.

Поверхнева експресія CD14 була підвищеною у 2 рази ($p < 0,05$) у щурів без ВК, яким вводили МРТР, але була достовірно зниженою у 4 рази ($p < 0,05$) у щурів з ВК, яким вводили МРТР, і у 2,9 разів ($p < 0,05$) у щурів з ВК, яким вводили фізіологічний розчин (рис. 13А). Число CD14 позитивних клітин було достовірно зниженим у щурів, яким вводили МРТР і щурів з експериментальним ВК, але не відрізнялося у щурів, яким вводили МРТР на тлі експериментального ВК (рис. 13В). Враховуючи те, що CD14 є моноцит-специфічним маркером і число циркулюючих моноцитів може бути залежним від ступеню їх транслокації до запаленої тканини, отримані дані можуть свідчити про підвищення рівня тканинної транслокації моноцитів.

Число CD69 позитивних моноцитів та інтенсивність поверхневої експресії CD69 були підвищеними у 1,8 ($p < 0,05$) та 6 разів ($p < 0,05$) відповідно у щурів, яким вводили МРТР на тлі експериментального ВК у порівнянні з контрольною групою, групою щурів, яким вводили МРТР та групою щурів, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК (рис. 13Б, Г). У щурів без ВК, яким вводили МРТР, поверхнева експресія CD69 на моноцитах була також підвищеною у 4 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 13Б). Число CD69 позитивних моноцитів у щурів, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК не відрізнялося від контрольних значень (рис. 13Г), в той час, як інтенсивність поверхневої експресії CD69 була підвищеною в три рази ($p < 0,05$).

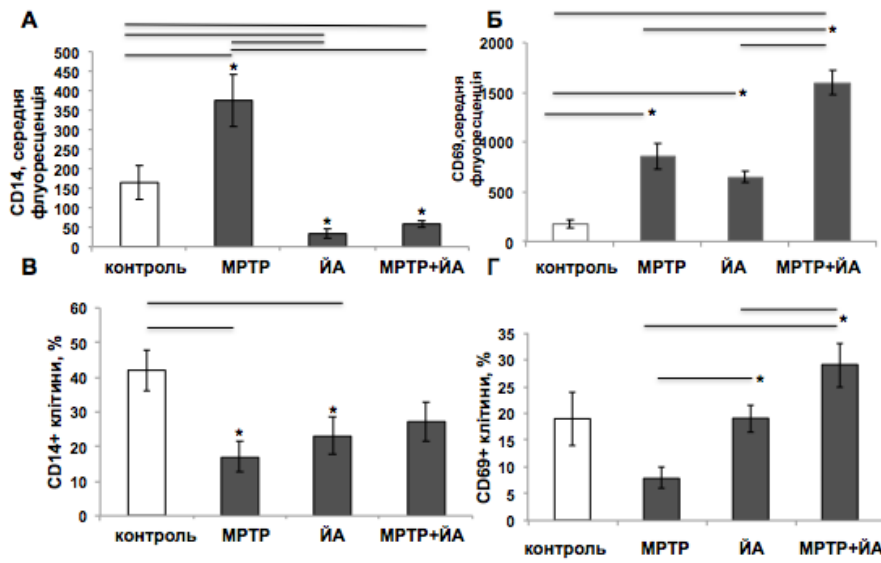


Рис. 13. Імунологічні показники периферичних моноцитів крові щурів після введення нейротоксину МРТР на тлі експериментального ВК: А та В - число CD14+ клітин та поверхнева експресія CD14 відповідно; Б та Г - число CD69+ клітин та поверхнева експресія CD69 відповідно; $M \pm SD$, $n=16$. * - $p < 0,05$

За даними досліджень на експериментальних моделях ВК у CD69 дефіцитних мишей був показаний розвиток важкого ступеню ВК та підвищення рівня транскриптів до прозапальних цитокінів [Yang F., 2015]. Надлишкова експресія CD69 індукувала продукцію толерогенних цитокінів та імуносупресивних клітин, які могли б пом'якшувати запалення у товстій кишці. У нашому дослідженні рівень експресії CD69 був значно підвищений у щурів, яким вводили МРТР на тлі експериментального ВК, що могло свідчити про залучення CD69 позитивних клітин у лімітуванні кишкового запалення, що підтверджує роль дофаміну, як негативного регулятора імунної відповіді у товстій кишці.

Нами було вперше показано, що руйнування периферичної дофамінергічної системи призводить до покращення морфологічних ознак експериментального коліту у щурів. Одним з можливих механізмів позитивного ефекту може бути регуляторний вплив дофамінергічної системи на фенотип моноцитів та їх респіраторну активність.

ВИСНОВКИ

Розвиток запалення за умов експериментального ВК пов'язаний з порушенням дофамінергічного сигналіngu в стінці товстої кишки. Периферична дофамінергічна система справляє переважно негативний вплив на перебіг експериментального ВК, що опосередковується змінами фагоцитарної активності та профілю гранулоцитів та моноцитів периферичної крові; і підвищенням ендотеліальної проникності.

1. Доведено, що за ЙА-індукованого ВК в слизовій оболонці товстої кишки щурів спостерігалось зниження рівня протеїнів ТН, MAO-B та ДАТ, що може свідчити про порушення метаболізму дофаміну в СОТК за умов запалення. Крім того, показано зміни рівня протеїну D2-DR в залежності від стадії перебігу експериментального ВК. Встановлено, що в нормі D3-DR локалізуються на ендотеліальних клітинах і ентеральних нейронах товстої кишки. При експериментальному ВК локалізації даних рецепторів була переважно епітеліальною, а їх рівень значно знижений.

2. Проаналізовано стан дофамінергічної системи СОТК пацієнтів на неспецифічний ВК у порівнянні з незапаленою кишкою. Показано зниження рівня протеїну ТН на 25%, Д2- та Д3-ДР на 70%. Вірогідних змін у рівні протеїну ДАТ не спостерігалось.

3. Активація Д2-ДР селективними агоністами квінпіролом та каберголіном мала антивиразковий та антизапальний ефект за умов ЙА-викликаного коліту у щурів. Цей ефект не пов'язаний зі змінами епітеліальної проникності СОТК щурів. Проте активація Д2-ДР призводила до пригнічення екстравазації альбуміну з кровоносних судин СОТК щурів, що свідчить про зменшення ендотеліальної проникності і, відповідно, запалення при ЙА-викликаному ВК. Позитивний ефект Д2-ДР на ендотеліальну проникність пов'язаний з переважанням активації центральних над периферичними Д2-ДР. В механізмі Д2-ДР-опосередкованого впливу на ендотеліальну проникність СОТК щурів за ЙА-викликаного ВК залучені Src- та Akt-протеїнкінази.

4. Активація Д3-ДР селективним агоністом 7-ОН-ДРАТ в низькій дозі (0,02 мг/100 г) достовірно знижувала клінічні, макро- та мікроскопічні прояви ЙА-викликаного коліту у щурів. Виявлено, що за розвитку ЙА-викликаного коліту спостерігається дисрегуляція між загальною концентрацією глікопротеїнів та складом їх вуглеводної частини, особливо за гострої стадії хвороби (0,5-6 год). Це проявлялось у поступовому зростанні концентрації глікопротеїнів, гексозамінів, сіалових кислот, проте концентрація гексоз і фукози була нижче за контрольні на 6 год перебігу ВК. Активація Д3-ДР призводила до одночасного підвищення концентрації загальних глікопротеїнів і гексоз у складі поверхневого слизу, а також до збільшення функціонального резерву перитонеальних макрофагів та тучних клітин за умов ЙА-викликаного ВК.

5. За руйнування периферичних дофамінергічних нейронів відбувається покращення морфологічних ознак експериментального ВК. Одним з можливих механізмів регулювання перебігу ЙА-індукованого коліту може бути регуляторний ефект дофамінергічного сигналіngu на фенотип моноцитів та їх респіраторну активність.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Prysiazhniuk A. The role of central and peripheral D2R receptors in the mechanism of colonic vascular permeability during experimental colitis in rats / Prysiazhniuk A., Dovbynchuk T., Kopyak B., Tolstanova G // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series "Problems of physiological functions regulation". -2017. –Vol. 1, №22. –P. 39-43. *(Здобувачем проведено експериментальне визначення ендотеліальної проникності, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку).*

2. A.I. Prysiazhniuk. Role of peripheral dopaminergic system in the pathogenesis of experimental colitis in rats / A.I. Prysiazhniuk, M.P. Rudyk, T.M. Chervinska, T.V. Dovbynchuk, I.V. Opeida, L.M. Skivka // Ukrainian Biochemical Journal. - 2017. – Vol. 89, № 4. – P. 56-67. *(Здобувачем проведено визначення рівня ферментів за*

руйнування периферичної дофамінергічної системи, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку).

3. Присяжнюк А.І. Загальна кількість та вуглеводний склад слизу товстої кишки щурів за умов експериментального коліту / Присяжнюк А.І., Шолох А.О., Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. - 2017. – Т. 2, № 78. – С. 56-61. *(Здобувачем проведено колориметричне визначення вуглеводного складу слизу СОТК щурів, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку).*

4. Prysiazhniuk A. Role of Dopamine and Dopamine D2 receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease / Tolstanova G., Deng X., Ahluwalia A., Paunovic B., Prysiazhniuk A., Ostapchenko L., Tarnawski A., Sandor Z., Szabo S // Digestive Diseases and Sciences. - 2015. - Vol. 60, № 10. – P. 2963-2975. *(Здобувачем проведено визначення рівнів протеїнів, залучених у дофаміновий сигналінг, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку).*

5. Присяжнюк А. Експресія та локалізація D3-дофамінових рецепторів за умов експериментального виразкового коліту / Присяжнюк А., Нестерук К., Червінська Т., Толстанова Г // Вісник Київського Національного Університету ім. Тараса Шевченка. - 2015. – Т. 2, № 19. - С. 10-13. *(Здобувачем проведено визначення рівня протеїну та локалізацію D3-ДР, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку).*

Тези наукових доповідей

1. Присяжнюк А.І. Роль периферичної дофамінергічної системи в патогенезі виразкового коліту у щурів / Присяжнюк А.І., Шолох А.О., Довбинчук Т.В., Червінська Т.М., Толстанова Г.М. // XI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених “Актуальні питання клінічної медицини” (27 жовтня 2017, Запоріжжя). - Запоріжжя, 2017. – С. 54-55.

2. Prysiazhniuk A. The mechanism of protective role of D3 dopamine receptors in pathogenesis of ulcerative colitis / Prysiazhniuk A., Dovbynychuk T., Holota Y., Varenjuk I., Garmanchuk L., Tolstanova G. // UEG J.- 2017. – Vol. 5, № 5 suppl. – P. 268.

3. Sholokh A., Prysiazhniuk A., Dovbynychuk T., Chervinska T. Effect of dopamine D3-receptor agonist on colonic mucus secretion during experimental colitis in rats / XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ” (25-27 квітня 2017, Львів). - Львів, 2017. - С. 70-71.

4. A.I. Prysiazhniuk. Microglia and circulating phagocyte metabolic profile in rats with MPTP-induced Parkinson's disease and concomitant ulcerative colitis / M.P. Rudyk, I.V. Opeida, V.M. Svyatetska, A.I. Prysiazhniuk [et al.] // 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (17-19 May 2017, Genoa). – Genoa, Italy, 2017. – P. 151-152.

5. Prysiazhniuk A. The role of dopaminergic system in inflammatory bowel disease pathogenesis / Tolstanova G., Chervinska T., Nesteruk K., Prysiazhniuk A., Dovbynychuk T., Kopyak B., Nurishenko N., Serhiychuk T., Garmanchuk L., Sagach V. // ‘Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century’ (14-15 April 2016, Kyiv). – Kyiv, 2016. – P. 112-113.

6. Присяжнюк А. Стан дофамінергічної системи товстої кишки пацієнтів з рецидивуючим виразковим колітом / Присяжнюк А., Дзюбенко Н., Толстанова Г. //

«Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Міжнародна наукова конференція-конкурс молодих вчених» (26-27 травня 2016, Київ). – Київ, 2016. – С. 86.

7. Prysiazhniuk A. The role of D3-dopamine receptors in the ulcerative colitis pathogenesis / Prysiazhniuk A., Dziubenko N., Kernychnyi V., Szabo S., Tolstanova G. // Book of abstracts of '9th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection' (15-17 September 2016, Cracow). – Cracow, Poland, 2016. - P. 45.

8. Присяжнюк А. Роль Д3-дофамінових рецепторів в патогенезі виразкового коліту / Присяжнюк А., Дзюбенко Н., Керничний В., Червінська Т., Толстанова Г. // “Об’єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень”, 10-11 листопада. – Київ, 2016. – С. 44-45.

9. Prysiazhniuk A. Impaired Peripheral Dopaminergic System in Patients with Ulcerative Colitis / Kernychnyi V., Dziubenko N., Prysiazhniuk A., Tolstanova G. // The FASEB Journal. – 2015. – Vol. 29, № 1. – Suppl. LB544.

10. Присяжнюк А. Стан дофамінергічної системи товстої кишки пацієнтів з рецидивуючим виразковим колітом / Присяжнюк А., Дзюбенко Н., Керничний В., Толстанова Г. // Конференція молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015” (23-24 квітня 2015, Київ). – Київ, 2015. – С. 55.

АНОТАЦІЯ

Присяжнюк А.І. Роль периферичної дофамінергічної системи в патогенезі запальних захворювань кишечника. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2017.

Дисертація присвячена вивченню стану периферичної дофамінергічної системи та ролі D2- та D3-дофамінових рецепторів (ДР) в патогенезі запальних захворювань кишечника. Встановлено, що у щурів з експериментальним колітом порушений дофамін-опосередкований сигналінг в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що обумовлено зниженням рівня ферментів тирозинової гідроксилази (ТН), моноамінооксидази-Б (МАО-Б), дофамінового транспортеру (ДАТ) і різнонаправленими змінами рівня D2- та D3-ДР. У біопсійному матеріалі товстої кишки пацієнтів на неспецифічний виразковий коліт також показано зниження рівня протеїну ТН, D2- та D3-ДР. Вперше доведено, що руйнування периферичних дофамінергічних нейронів призводить до покращення проявів експериментального коліту. Одним з механізмів, що лежить в основі захисної дії дофамінергічної системи в патогенезі виразкового коліту є підтримка цілісності кишкового бар’єру. Захист ендотеліального бар’єру частково опосередковується через активацію центральних D2-ДР. Доведено, що застосування препаратів з дофамінергічною активністю, а саме агоністів D2- та D3-ДР, є ефективним в прискоренні загоєння уражень при експериментальному коліті і може бути рекомендованим для подальшого клінічного випробування.

Ключові слова: периферична дофамінергічна система, дофамінові рецептори, запальні захворювання кишечника, експериментальний коліт у щурів,

неспецифічний виразковий коліт, модель руйнування периферичних дофамінергічних нейронів, кишковий бар'єр, імунологічні показники крові.

АННОТАЦІЯ

Присяжнюк А.И. Роль периферической дофаминергической системы в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.04 - биохимия. –Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2017.

Диссертация посвящена изучению состояния периферической дофаминергической системы и роли D₂- и D₃-дофаминовых рецепторов (DR) в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника. Установлено, что у крыс с экспериментальным колитом нарушен дофамин-опосредованный сигналинг в слизистой оболочке толстой кишки, обусловленное снижением уровня ферментов тирозиновой гидроксилазы (ТН), моноаминоксидазы-Б (МАО-Б), дофаминового транспортера (ДАТ) и разнонаправленными изменениями уровня D₂- и D₃-DR. В биопсийном материале толстой кишки пациентов с неспецифическим язвенным колитом также показано снижение уровня протеинов ТН, D₂- и D₃-DR. Впервые доказано, что разрушение периферических дофаминергических нейронов приводит к улучшению проявлений экспериментального колита. Одним из механизмов, которые лежат в основе защитного действия дофаминергической системы в патогенезе язвенного колита, есть поддержание целостности кишечного барьера. Защита эндотелиального барьера частично опосредована активацией центральных D₂-DR. Доказано, что применение препаратов с дофаминергической активностью, а именно агонистов D₂- и D₃-DR, эффективно в ускорении заживления повреждений при экспериментальном колите и может быть рекомендованым для дальнейшего клинического испытания.

Ключевые слова: периферическая дофаминергическая система, дофаминовые рецепторы, воспалительные заболевания кишечника, экспериментальный колит у крыс, неспецифический язвенный колит, модель разрушения периферических дофаминергических нейронов, кишечный барьер, иммунологические показатели крови.

SUMMARY

***Prysiashniuk A.I. The role of peripheral dopaminergic system in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.* – Manuscript.**

Dissertation for the candidate of biological sciences degree by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

Dissertation is dedicated to the investigation of peripheral dopaminergic system and role of D₂- and D₃-dopamine receptors (DR) in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Ulcerative colitis (UC) is the chronic inflammatory disease of the unknown etiology. Little is known on the role of peripheral dopaminergic system in the pathogenesis of UC, despite the evidence that dopaminergic hypoactivity may result in excessive inflammation. The development of inflammation under the conditions of

experimental UC is associated with a violation of dopaminergic signaling in the colon. The peripheral dopaminergic system causes a predominantly negative effect on the experimental UC flow, which is mediated by changes in phagocytic activity and profile of granulocytes and peripheral blood monocytes; and increased endothelial permeability. It was shown that during experimental UC levels of proteins TH, MAO-B and DAT were decreased in the rat colon mucosa, which may indicate about the impaired dopamine metabolism in colonic mucosa during inflammation. In addition, changes in the level of protein D2-DR were shown, which were dependent on the stage of experimental UC. It is established that in the normal condition, D3-DR are localized on the endo- and epithelial cells and the enteric neurons of the colon. During the experimental UC, the localization of D3-DR was predominantly epithelial, and their level was significantly reduced. The state of the dopaminergic system of patients with non-specific UC in comparison to non-inflamed colon was analyzed. It was shown that level of protein TH was decreased by 25%, D2- and D3-DR by 70% in inflamed colon. There were no apparent changes in the protein level of DAT. Activation of D2-DR by selective agonists quinpirole and cabergoline had an anti-ulcer and anti-inflammatory effect during experimental colitis in rats. This effect was not related to changes in the epithelial permeability of rat's colon mucosal layer. However, D2-DR activation led to the inhibition of the extraction of albumin from the blood vessels of the rat's colon mucosal layer, indicating a decrease in endothelial permeability and, accordingly, inflammation during experimental UC. The positive effect of D2-DR on endothelial permeability is associated with the predominance of activation of the central D2-DR. Src- and Akt-protein kinases are involved in the mechanism of D2-DR-mediated influence on the endothelial permeability of colon mucosal layer in rats with experiental UC. Activation of the D3-DR by the low-dose of selective agonist 7-OH-DPAT (0.02 mg / 100 g) significantly reduced the clinical, macro, and microscopic manifestations of experimental UC in rats. It was found that the development of experimental UC had a dysregulation between the total concretion of glycoproteins and the composition of their carbohydrate part, especially during the acute stage of the disease (0.5-6 h). This was manifested in the gradual increase in the concentration of glycoproteins, hexosamines, sialic acids, but the concentration of hexoses and fucose was lower than control at 6 hours of experimental UC. The activation of D3-DR resulted in the simultaneous increase of the concentration of general glycoproteins and hexoses in the surface mucus, as well as to the increase in functional reserve of peritoneal macrophages and mast cells under experimental UC. During the destruction of peripheral dopaminergic neurons we observed an improvement in the morphological characteristics of experimental UC. One of the possible regulatory mechanism on the experimental UC flow may be the regulatory effect of dopaminergic signaling on the phenotype of monocytes and their respiratory activity.

Keywords: peripheral dopaminergic system, dopamine receptors, inflammatory bowel diseases, experimental colitis in rats, non-specific ulcerative colitis, model of peripheral dopaminergic neurons destruction, colon barrier, blood immunologic indexes.