

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

АЛЕКСАНДРОВ АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК: 577.112.2:612.128

**БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ
НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ ПРОГЕСТЕРОН-
ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ**

03.00.04-біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

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, професор
Остапченко Людмила Іванівна,
Київський національний університет імені
Тараса Шевченка МОН України,
директор ННЦ «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України МОН України,
професор кафедри біохімії і фізіології тварин
імені академіка М.Ф.Гулого

доктор медичних наук, професор
Непорада Каріне Степанівна
завідувач кафедри біоорганічної та біологічної хімії
Української медичної стоматологічної академії

Захист дисертації відбудеться «16» грудня 2019 року о 16:00 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.М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий «13» листопада 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24



Н. Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Згідно статистики Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВОЗ) у світі існує глобальна проблема ожиріння. Наявність ожиріння супроводжується важкими побічними захворюваннями такими, як цукровий діабет 2 типу, метаболічний синдром, хвороби серцево-судинної системи та розвитком раку стравоходу, підшлункової залози, товстої та прямої кишки, молочної залози, ендометрію, нирок та жовчного міхура [Kratz M. et al, 2013; Iyengar M. et al, 2016].

Основними причинами розвитку ожиріння є надмірне споживання їжі, недостатність фізичної активності, гормональні порушення, наявність пухлин [Engin A. et al, 2017]. Біохімічні механізми розвитку ожиріння, викликаного дією жіночого статевого гормону прогестерону, який використовується для контрацепції та гормон-замісної терапії, є мало вивченими. Відомо, що нейроактивний стероїд прогестерон, продукція якого посилюється в передменструальний період та при вагітності, може посилювати споживання їжі, впливаючи на харчову поведінку [Hildebrandt T. et al, 2015], [Klump K. et al, 2013]. Відомо, що прогестерон, який потрапляє в жіночий організм штучно, призводить до ефекту накопичення жиру [Amatayakul K. et al, 1980], [Bonny A. et al, 2014]. Проте, незважаючи на велику кількість даних щодо механізмів розвитку ожиріння (наприклад, дієт-індукованого), результати отримані на моделі прогестерон-індукованого ожиріння, є дуже обмеженими.

Тому вивчення процесів, які виникають в організмі на тлі ожиріння, викликаного прогестероном, є особливо актуальним. Зокрема, важливо знайти найбільш чутливі ланки, які порушуються за даної хвороби.

Численні дослідження вказують, по перше, на те, що жирова тканина є динамічним органом, який різними шляхами підтримує свій гомеостаз, і, по друге, що ожиріння призводить до дисфункції жирової тканини та патофізіології всього організму [Lee M. et al, 2013]. Ці патофізіологічні процеси опосередковані не тільки метаболітами жирової тканини, так і сигнальними молекулами, що продукують адипоцити – адипокінами, які мають паракринну, так і ендокринну регуляторну функцію [Tchkonina T. et al, 2013].

Показано, що при ожирінні в адипозній тканині виникає локальне хронічне запалення, яке згодом переходить у системне [Engeli S. et al, 2003]. Гіпертрофія адипоцитів внаслідок накопичення в них жиру призводить до посилення продукції ними медіаторів запалення (TNF- α , IL-8), що зумовлює рекрутування до жирової тканини макрофагів, які в свою чергу виробляють прозапальні цитокіни адипокіни [Pasarica M. et al, 2009; Sun K. et al, 2013]. Наслідком цього є виникнення запального статусу [Weisberg S. et al, 2003], що супроводжується оксидативним стресом [Trauhurn P. et al, 2008]. Про розповсюдження запалення на весь організм свідчить поява у крові прозапальних цитокінів [Curat C. et al, 2006]. Оксидативний стрес теж набуває системного характеру, що, у свою чергу, призводить до вичерпання антиоксидантних систем [Amirkhizi F. et al, 2007], [Fernández-Sánchez A. et al, 2011].

У зв'язку з цим в плані корекції наслідків ожиріння, пов'язаних з оксидативним стресом, перспективними є застосування сполук із антиоксидантними

властивостями. Останнім часом спостерігається великий інтерес до вивчення сприятливого впливу поліфенолів, які здатні запобігати розвитку ожиріння та хронічних порушень, пов'язаних з ожирінням. Поліфенолвмісні екстракти зеленого, чорного чаю та чаю улун зменшують рівень запальних процесів у мишей із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою, і зменшують кількість вісцерального жиру [Uchiyama S. et al, 2011; Heber D. et al, 2014].

Меланін з антарктичних дріжджів, який виявляє антиоксидантні властивості, привертає особливу увагу, як перспективний інструмент для зменшення окисного стресу і, тому як потенційний засіб лікування ожиріння. Дослідження впливу меланіну при інших патологіях показали, що він володіє антиоксидантними, протизапальними, протипухлиними та антистресовими властивостями [Чижанська Н., 2007; Голишкін Д., 2015, Taburets O. et al, 2016; Permyakova N. et al, 2016; Воронина О. et al, 2017; Kondratiuk T. et al, 2017]. Оскільки меланін є поліфенольною сполукою, яка володіє достатньо широким спектром дії на метаболічні процеси, для нас цікаво було дослідити вплив цієї речовини на стан організму експериментальних щурів за умов розвитку ожиріння, індукованого прогестероном.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми: «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи було оцінити біохімічні та імунологічні показники в організмі експериментальних тварин за прогестерон-індукованого ожиріння.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити вплив довготривалого введення прогестерону на органометричні параметри (масу тіла, індекс маси тіла (ІМТ), кількість вісцеральної жирової тканини) та харчову поведінку піддослідних тварин.

2. Вивчити основні показники ліпідного обміну у сироватці крові щурів на моделі прогестерон-індукованого ожиріння.

3. З'ясувати стан системи обміну серотоніну у мозку щурів при введенні прогестерону та виявити її зв'язок із рівнем амінокислот з розгалуженими бічними ланцюгами сироватці крові.

4. Дослідити вплив прогестерону на показники запалення у щурів, такі як рівні прозапальних (IL-1 та IFN- γ) і протизапальних (IL-4, IL-10, TGF- β) цитокінів та маркери поляризації перитонеальних макрофагів (продукцію NO, рівень АФК й активність аргінази).

5. Вивчити вплив меланіну з дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X1 на вказані вище показники у щурів при його сумісному введенні з прогестероном для виявлення його можливого ефекту як засобу профілактики ожиріння.

Об'єкт дослідження: ожиріння за умов довготривалого введення прогестерону.

Предмет дослідження: ключові органометричні, біохімічні та імунологічні параметри за умов довготривалого введення прогестерону.

Методи дослідження: хроматографічні (визначення концентрацій амінокислот сироватки крові), імуноферментний аналіз (вміст інтерлейкінів), колориметричні (НСТ тест для визначення продукції активних форм кисню перитонеальними макрофагами, аргіназна активність, продукція NO), спектрофотометричні (вміст ліпідів, стан системи обміну серотоніну) та статистичні методи досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Досліджено та показано вплив жіночого статевого гормону прогестерону на основні метаболічні процеси, що призводять до розвитку ожиріння. Вперше було показано, що прогестерон впливає на шлях обміну серотоніну у головному мозку щурів, який відповідає за харчову поведінку та відповідно на розвиток ожиріння. Показано, що при довготривалому введенні прогестерону порушується баланс між вмістом різних ліпідів у сироватці крові щурів, що є свідченням порушення ліпідного обміну. Продемонстровано вплив прогестерону на розвиток хронічного запалення у жировій тканині, про що свідчить поляризація макрофагів за прозапальним M1 типом. Вперше показано, що довготривале введення прогестерону щурам сприяє розвитку системного запального процесу, що проявляється у підвищенні рівня прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- γ) та зниженні рівню протизапальних (IL-4, IL-10, TGF- β) у сироватці крові. Виявлено коригуючий вплив меланіну на біохімічні та імунологічні процеси, які зазнають порушень при прогестерон-індукованому ожирінні у щурів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати розкривають біохімічні та імунологічні процеси, які порушуються при ожирінні гормонального генезу. Комплексне вивчення механізмів розвитку ожиріння, індукованого введенням прогестерону, дозволить визначити основні мішені для профілактики та лікування даних порушень.

Встановлено, що меланін перешкоджає розвитку ожиріння у щурів на моделі прогестерон-індукованого ожиріння, нормалізуючи органометричні параметри, усуваючи дисліпідемію та нормалізуючи вміст серотоніну в головному мозку, а також проявляючи протизапальні властивості шляхом усунення дисбалансу між рівнями про- і протизапальних цитокінів та запобігаючи поляризації перитонеальних макрофагів за M1 типом. Меланін може бути перспективним потенційним засобом для профілактики ожиріння, індукованого прогестероном.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проведено пошук та аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, оброблено та теоретично обґрунтовано отримані результати досліджень, сформульовано висновки та підготовлено матеріали для публікацій.

Вибір теми дисертаційної роботи, планування досліджень та інтерпретація отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником.

Автор висловлює глибоку вдячність к.б.н. Конопельнюк В.В. та к.б.н. Компанець І.В. за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи представлена в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації було представлено на вітчизняних та міжнародних конференціях: «Біологічні дослідження» (Житомир, 2016), «Рівень ефективності та необхідність впливу медичної науки на розвиток медичної практики» (Київ, 2016), XII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016), «Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century» (Kyiv, 2018), FEBS 3+ meeting - XI Parnas Conference «Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine» (Kyiv, 2018), «Modern aspects of biochemistry and biotechnology-2019» (Kyiv, 2019).

Публікації. За темою дисертації було опубліковано 11 наукових праць, з яких: 5 статей у наукових фахових виданнях, з яких 2 статті у наукових виданнях інших держав, що індексуються наукометричними базами даних. А також 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 141 сторінці друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел (182 найменувань), містить 2 таблиці та 39 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах (самках) масою 180-200 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію з дотриманням міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986).

Експериментальне ожиріння індукували шляхом внутрішньом'язевого введення прогестерону (Біофарма, Україна) з розрахунку 10 мг на 1 кг маси тіла тварини протягом 28 діб. Вибір дози прогестерону, яку отримували дослідні щури, ґрунтувався на данні попередніх досліджень ефекту нейростероїдів на харчову поведінку, у яких доза прогестерону 10 мг/кг ваги спричиняла найбільш виражений гіперфагичний ефект у мишей [Reddy D. et al, 1998] та, відповідно, використовувалась для розвитку експериментальних моделей ожиріння [Gundamaraju R. et al, 2013; Suneetha D. et al, 2013].

Упродовж першого тижня всі щури отримували стандартну їжу «Purina rodent chow» і воду ad libitum. На 8 добу тварини рандомізовано було розділено на 3 групи:

Тварини першої групи (Контроль) протягом 28 днів перебували в стандартних умовах та споживали стандартний корм;

Тваринам другої групи (Прогестерон), щоденно вводили розчин прогестерону у дозі 10 мг/кг ваги тварини шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій упродовж 28 діб;

Тваринам третьої групи (Прогестерон+меланін), щоденно вводили розчин прогестенону у дозі 10 мг/кг ваги тварини шляхом внутрішньом'язевих ін'єкцій та розчин меланіну у дозі 1 мг/кг перорально упродовж 28 діб.

Як джерело меланіну, у роботі було використано екстракт із дріжджоподібних грибів *Nadsoniella nigra* штаму X1.

У всіх досліджуваних групах щурів масу тіла, та споживання корму реєстрували щоденно. Індекс маси тіла (ІМТ) (відношення маси тіла (г) щурів до квадрату довжини тіла (см²) [Novelli E., 2007] було розраховано в кінці експерименту.

У кінці досліджень тварин евтаназували за допомогою двоокису вуглецю, отримували перитонеальні макрофаги, сироватку крові, гомогенат головного мозку та вісцеральний жир. Біохімічний аналіз крові (вміст холестеролу, тригліцеридів, ліпопротеїнів високої щільності, ліпопротеїнів низької щільності) щурів визначали за допомогою методів із перебігом специфічних ферментативних реакцій з використанням реагентів PLIVA-Lachema Diagnostika (Чехія) після чого продукти реакцій визначали спектрофотометрично за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Microlab 300 ("Vital Scientific", Нідерланди).

Концентрацію вільних амінокислот в крові визначали на автоматичному амінокислотному аналізаторі Т-339 (Microtekno, Чехія) методом іонообмінної хроматографії у літій-цитратному буфері в одноколунковому циклі.

Виділення серотоніну та триптофану проводили використовуючи іонно-обмінну хроматографію [Максименко Е., 2000]. Вміст серотоніну та триптофану визначали спектрофлуорометричними методами [Gaitonde M., 1974 та Weissbach H., 1954]. Визначення активності триптофан-гідроксилази, індоламін 2,3-діоксигенази (ІДО), моноаміноксидазної та триптофан-декарбоксілазної активності активності (МАО) проводили згідно з спектрофлуорометричними та спектрофотометричними методами [Kuhn D. et al, 1980; Kudo Y. et al, 2000; Ali B. et al., 2000; Sangwan R. et al, 1998], відповідно, із спектрофотометричним визначенням оптичної щільності продукту реакції. Виділення 5-гідрокситриптофану з тканин мозку проводили методом екстракції, а визначення вмісту проводили спектрофлуорометричним методом [Калниня І., 1991].

Перитонеальні макрофаги культивували у середовищі RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США) із додаванням 10% бичачого сироваткового альбуміну BSA (Sigma-Aldrich, США) та 1% гентаміцину (Sigma-Aldrich, США). Виробництво NO перитонеальними макрофагами аналізували шляхом вимірювання накопичення його стабільних продуктів розпаду, таких як нітрити [Skivka L. et al, 2013]. Концентрацію NO вимірювали за допомогою реагенту Гріса з подальшим спектрофотометричним визначенням. Вміст NO виражався у ммоль на 10⁶ клітин. Визначення продукції активних форм кисню (АФК) проводили за допомогою тесту з 0,1% нітросинім тетразолій хлоридом (НСТ). Після 15 хвилинного культивування перитонеальних макрофагів з НСТ реагентом, проводили активацію продукції активних форм кисню із додаванням Зимозану А (з *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, США). Реакцію зупиняли додаванням 2 М КОН, внутрішньоклітинний диформазан розчиняли у 50% диметил сульфоксиді (DMSO, Sigma-Aldrich, США) із подальшим

спектрофотометричним визначенням. Для визначення аргіназної активності культивували перитонеальні макрофаги лізували за допомогою 0.1% Triton X-100. Аргіназна активність стимулювалась додаванням 50 мМ Tris-HCl, 1.0 μ М MnCl₂ та 0.5 М аргініну. Для колориметричного визначення додавали 6% α -іонітроспропіофенон (α -ISPP), розчинений в етанолі. Аргіназну активність виражали в одиницях активності (кількість ферменту, яка необхідна для гідролізу 1 μ М аргініну за хвилину).

Для визначення концентрацій цитокінів (IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-10, TGF- β) був проведений імуноферментний аналіз ELISA із подальшою колориметричною детекцією за загальною методикою для розчинних білків [Crowther J., 2001].

Визначення концентрації білка проводили за методом [Bradford M., 1976].

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерних програми «Origin Pro 7.0» та «STATISTICA 7.0». Основні статистичні показники підраховували шляхом обчислення середнього арифметичного значення (M), стандартної середньої арифметичної похибки (m). Різницю показників оцінювали параметричними методами варіаційної статистики ANOVA. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій

Результати досліджень та їх обговорення

Нами було змодельовано ожиріння за умов довготривалого введення прогестерону у щурів. Для підтвердження розвитку ожиріння за умов введення прогестерону було оцінено антропометричні та органометричні параметри щурів. В роботі показано, що розвиток ожиріння супроводжується збільшенням маси тіла дослідної групи (рис. 1).

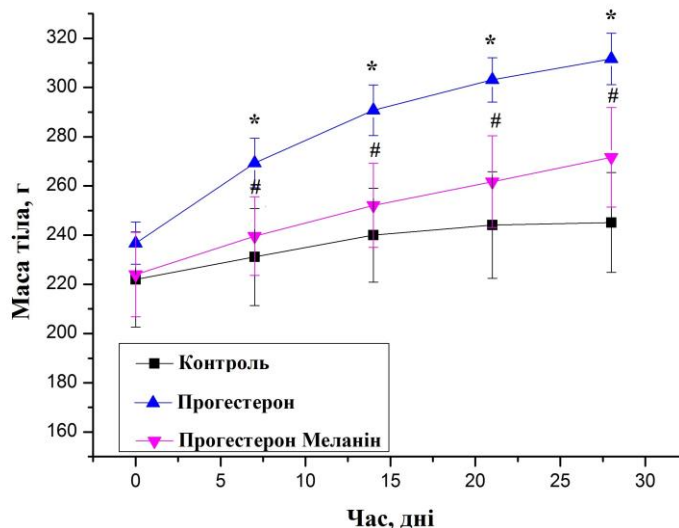


Рис. 1. Маса щурів за умов експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

Маса щурів контрольної групи наприкінці експерименту становила 245 ± 20 г, що на 23 г вище порівняно з вихідною масою тварин (рис. 1). Було встановлено, що маса щурів після довготривалого щоденного введення прогестерону була більшою на 27% ніж у щурів контрольної групи (початкова маса – 236 ± 8 г, маса на кінець експерименту – 311 ± 11 г ($p < 0,05$)). Порівнюючи цей показник із результатами отриманими при одночасному введенні меланіну та прогестерону, можна побачити, що введення меланіну зменшує приріст маси тіла на 60% (початкова маса – 224 ± 17 г, маса на кінець експерименту – 271 ± 20 г) ($p < 0,05$).

Отримані данні пояснюються тим, що прогестерон, як і інсулін, стимулює роботу синтази жирних кислот, що є потенційним механізмом його впливу на ріст адипоцитів. У попередніх дослідженнях було показано, що прогестерон регулює експресію гену регулятора транскрипції синтази жирних кислот ADD1/SREBP1c у культивованих клітинах преадипоцитів отриманих з жирової тканини щурів [Eberlé D. et al, 2004]. Тому, ми припускаємо, що виявлене нами збільшення маси тіла щурів, яким вводили прогестерон, може бути наслідком стимуляції синтезу жирів в адипоцитах та, відповідно, накопичення його в них

Для аналізу змін у композиції тіла було проведено вимірювання показника індексу маси тіла у щурів за умов розвитку експериментального ожиріння викликаного введенням прогестерону в порівнянні з контрольною групою тварин (рис. 2). В результаті досліджень показано, що індекс маси тіла у щурів контрольної групи тварин після 4 тижнів експерименту становив $0,67 \pm 0,03$ г/см² (рис. 2А). При цьому у щурів з ожирінням індукованим довготривалим введенням прогестерону призвело до підвищення ІМТ до $0,92 \pm 0,05$ г/см² ($p < 0,05$). Індекс маси тіла щурів після 4 тижнів одночасного введення прогестерону та меланіну становив $0,6 \pm 0,03$ г/см². Показники ІМТ у тварин при введенні меланіну змінились до показників контрольної групи тварин.

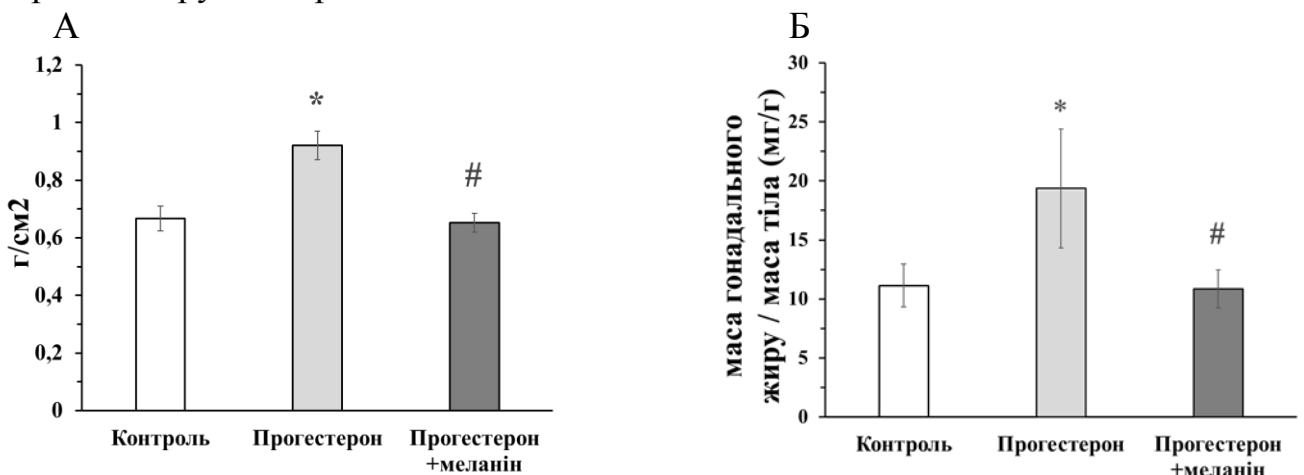


Рис. 2. Індекс маси тіла (А) та маса гонадального жиру (Б) щурів за умов експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

Розподілення жирової тканини по організму є важливим та незалежним фактором ризику серцево-судинних захворювань у чоловіків та жінок. Уже при переході нормальної кількості вісцерального жиру в надлишкову відбувається ряд метаболічних перебудов – збільшення кількості підшкірного жиру, жирової маси тіла, холестеролу у складі ліпопротеїнів низької щільності, глікемія. При проведенні

лапоротомії дослідних тварин ми виявили, що щури, яким вводили прогестерон, мають в середньому на 80% ($p < 0,05$) більшу кількість вісцеральної жирової тканини саме в області сечо-статевої системи у порівнянні із параметрами щурів контрольної групи (рис. 2Б). У результаті вимірювань вісцеральної жирової тканини в області сечостатевої системи щурів було показано, що при одночасному введенні прогестерону та меланіну кількість жирової тканини щурів значно зменшувалась в порівнянні із показниками щурів яким вводили тільки прогестерон. При введенні прогестерону та меланіну спостерігали відновлення значень цього показника до значень щурів контрольної групи.

Так як, у даній роботі при дослідженні ожиріння використовували модель тварин, яким протягом тривалого часу вводили гормон прогестерон, який викликає гіперфагичний ефект, важливо було дослідити його вплив на харчову поведінку. Загальна кількість спожитого корму щурами протягом 28 днів експериментальної групи була на 17% ($p < 0,05$) вищою, ніж у контрольній групі тварин. Можна припустити, що довготривале введення прогестерону впливає на центри насичення у дослідних тварин. Але механізм зв'язку між прогестероном, серотоніном і харчовою поведінкою не зовсім зрозумілий.

Відомо, що такі стани, як ожиріння, метаболічний синдром, атеросклероз та цукровий діабет супроводжуються порушенням обміну поживних речовин, зокрема ліпідів. Для дослідження ліпідного обміну ми проводили вимірювання рівнів циркулюючих у сироватці крові щурів вільного холестеролу, тригліцеридів, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) та ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ). Результати даних досліджень відображені в таблиці 1.

Таблиця 1

Концентрації ліпідів у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону ($M \pm m$, $n=10$)

	Холестерол (ммоль/л)	Тригліцериди (ммоль/л)	ЛПНЩ (ммоль/л)	ЛПВЩ (ммоль/л)	ЛПДНЩ (ммоль/л)
Контроль	2,12±0,21	1,06±0,24	0,15±0,02	2,20±0,31	0,20±0,04
Прогестерон	3,12±0,52*	2,12±0,47*	0,23±0,01*	1,51±0,20*	0,45±0,01*
Прогестерон+ меланін	2,20±0,36 [#]	1,25±0,28 [#]	0,19±0,01* [#]	2,2±0,30 [#]	0,20±0,01 [#]

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

В результаті проведених досліджень показано, що за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого довготривалим введенням прогестерону підвищення концентрацій вільного холестеролу у 1,5 разів, тригліцеридів – у 2 рази, ЛПНЩ – у 1,5 рази та ЛПДНЩ у 2,2 рази, у порівнянні із показниками контрольної групи тварин ($p < 0,05$). Необхідно зазначити, що при цьому рівень ЛПВЩ був у 1,5 рази нижчим в порівнянні із показниками контрольної групи ($p < 0,05$). Отримані нами данні можуть свідчать про розвиток дисліпідемії за умов розвитку гормонального типу ожиріння. Виявлене нами підвищення вмісту триацилгліцеролів

може призводити до зниження синтезу ЛПВЩ та стимулювати утворення ЛПНЩ та ЛПДНЩ [Kesaniemi Y et al., 1983; Arai T et al., 1994; Perret V. et al., 2002].

При одночасному введенні прогестерону та меланіну щурам протягом 28 днів для попередження розвитку ожиріння, спостерігалися значні відмінності між показниками цих тварин та тварин, яким вводили тільки прогестерон для розвитку ожиріння. В ході досліджень нами було виявлено, що введення меланіну одночасно з введенням прогестерону призводить до зменшення концентрацій холестеролу, тригліцеридів, ЛПНЩ, ЛПДНЩ у порівнянні із показниками групи щурів із експериментальним ожирінням індукованим введенням прогестерону. Також при одночасному введенні прогестерону та меланіну спостерігали збільшення концентрацій ЛПВЩ ($p < 0,05$) в сироватці крові щурів. При одночасному введенні прогестерону та меланіну для попередження розвитку ожиріння всі показники ліпідного профілю були в межах контрольних значень.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження процесів біосинтезу серотоніну за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону. В даній роботі було розглянуто ключові продукти та ферменти шляху біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів.

В результаті проведених досліджень встановлено, що концентрація триптофану – попередника синтезу серотоніну у головному мозку щурів зросла в 2,2 рази ($p < 0,05$) за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого довготривалим введенням прогестерону порівняно з контрольною групою (рис 3А). Згідно з аналізом літературних даних та аналізом отриманих нами результатів однією з причин зростання концентрації триптофану в головному мозку може бути зниження конкуренції між триптофаном та іншими амінокислотами за проходження гематоенцефалічного бар'єру.

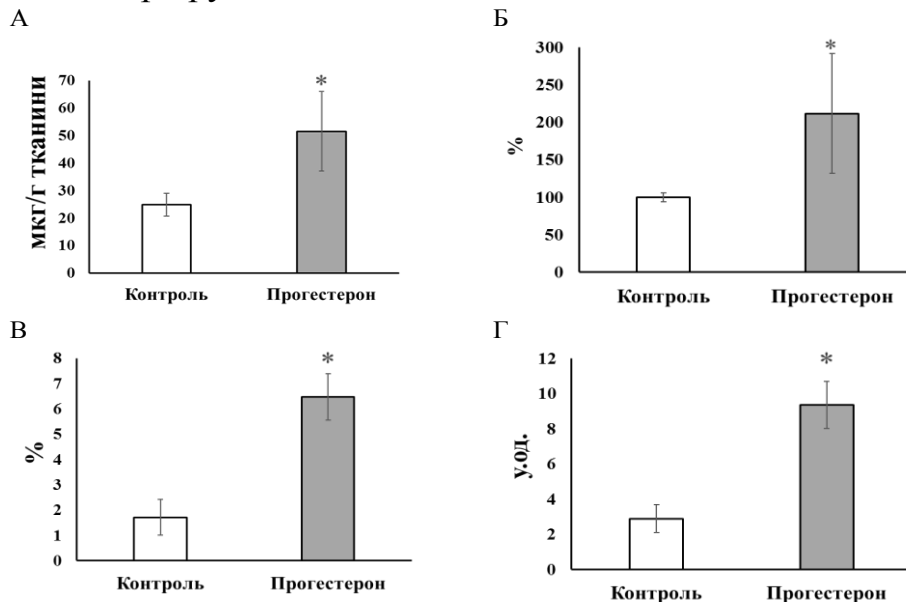


Рис. 3. Вміст триптофану (А), 5-гідрокситриптофану (Б), серотоніну (В) та 5-гідроксиіндолоцтової кислоти (Г) у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

*- різниця достовірна у порівнянні із контролем, $p < 0,05$

Першим етапом біосинтезу серотоніну є гідроксилювання триптофану з утворенням проміжного метаболіту - 5-гідрокситриптофану. Тож як показано на рисунку 3Б, концентрація 5-гідрокситриптофану збільшилася в 2,1 рази в головному мозку щурів за умов розвитку ожиріння порівняно з контрольною групою тварин. Концентрація продукту триптофан-декарбоксілазної активності - серотоніну збільшилася в 3,3 рази у щурів за умов розвитку ожиріння гормонального типу (рис. 3Г).

Наступним етапом роботи було визначення активності ферментів в головному мозку щурів, які залучені в процеси біосинтезу та катаболізму серотоніну (рис. 4).

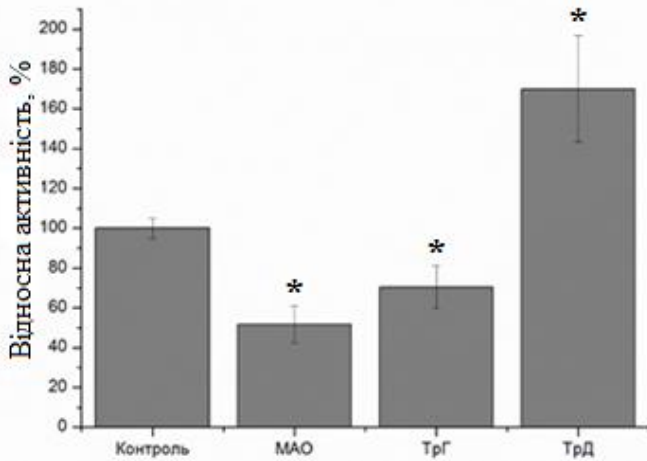


Рис 4. Відносна активність моноаміноксидази (MAO), триптофан-5-гідроксилази (TrH) та триптофан-декарбоксілази (TrD) у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* різниця достовірна у порівнянні із контролем, $p < 0,05$

Згідно з отриманими нами результатами активність швидкості-лімітуючого ферменту триптофан-гідроксилази знижувалась на 25% у групі щурів з ожирінням в порівнянні з контрольною групою (рис 4). Активність триптофан-декарбоксілази зростала і склала 170% ($p < 0,05$) у порівнянні з показниками щурів контрольної групи тварин.

Оскільки серотонін відіграє важливу роль в регуляції відчуття насичення, а також попередніми дослідженнями було показано залучення серотоніну в механізми розвитку цукрового діабету 2 типу наступним етапом було визначення вмісту серотоніну в головному мозку щурів за умов розвитку ожиріння індукованого введенням прогестерону. Дані результати представлені на рисунку 5.

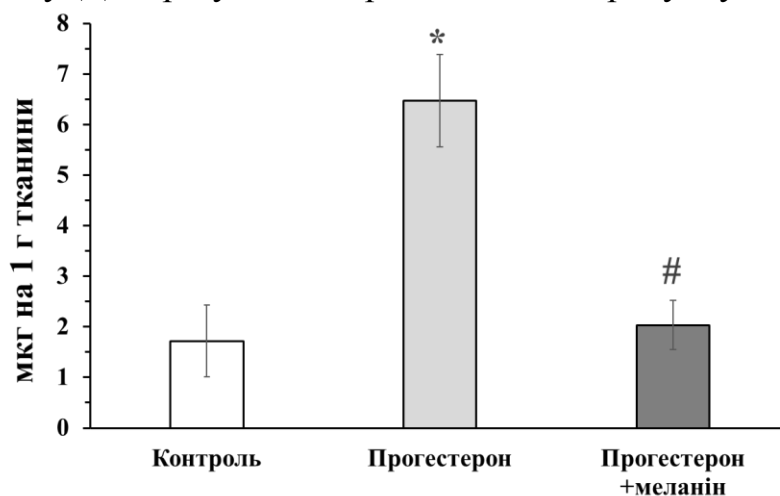


Рис. 5. Вміст серотоніну у тканинах головного мозку щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

В результаті досліджень ми спостерігали підвищення вмісту серотоніну у головному мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону майже у 4 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з показниками контрольної групи тварин. При одночасному введенні прогестерону та меланіну рівень серотоніну значно зменшувався і був на 20% більшим за показники контрольної групи тварин (рис. 5).

Отримані дані по вмісту серотоніну можуть бути пояснені підвищеною концентрацією триптофану – початкового метаболіту серотонінергічної системи, підвищеною активністю триптофан-декарбоксилази та зменшенням активності MAO.

Так як зростання вмісту серотоніну в мозку щурів з прогестерон-індукованим ожирінням може бути пов'язано не тільки зі збільшенням продукції цього нейромедіатора, а й з зниженням процесів його катаболізму, наступним етапом нашого дослідження було визначення активності ферменту моноамінооксидази (MAO), який забезпечує деградацію серотоніну, за допомогою окисного дезамінування до 5-гідроксиіндолоцтової кислоти. Активність MAO зменшилась і становила 52% ($p < 0,05$) від активності у щурів контрольної групи (рис. 4), а концентрація 5-гідроксиіндолоцтової кислоти збільшилась у 3 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з контрольною групою щурів (рис. 3). Зафіксоване нами зниження активності MAO може бути пов'язано з деактивацією даного ферменту, що, в свою чергу, може привести до зростання пулу біогенних амінів, зокрема серотоніну.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами встановлено дисбаланс у шляху метаболізму серотоніну в головному мозку щурів, при розвитку гормонального ожиріння, індукованого довготривалим введенням прогестерону, що свідчить про залучення функціонування серотонінергічної нейротрансмітерної системи в механізми розвитку ожиріння гормонального генезу. На основі отриманих даних, можна зробити висновок, що система метаболізму серотоніну може бути використана як потенційна мішень для корекції метаболічного дисбалансу при розвитку гормонально-індукованого ожиріння.

Транспорт амінокислот із розгалуженим бічним радикалом та триптофану через гематоенцефалічний бар'єр відбувається за рахунок транспортеру великих нейтральних амінокислот. Тому, було досліджено рівні амінокислот із розгалуженим бічним радикалом (валін, лейцин, ізолейцин) у сироватці крові щурів (рис. 6). Встановлено, що рівні валіну та лейцину були, відповідно, у 58% і 50% ($p < 0,05$) нижчими у щурів із ожирінням, яке було індуковане довготривалим введенням прогестерону, ніж у щурів контрольної групи.

Показане нами зростання вмісту триптофану у головному мозку може бути обумовлене конкуренцією даної ароматичної амінокислоти з валіном та лейцином за транспорт LAT1 для проходження гематоенцефалічного бар'єру, що у свою чергу впливає на підвищення рівня серотоніну та порушення харчової поведінки при довготривалому введенні прогестерону.

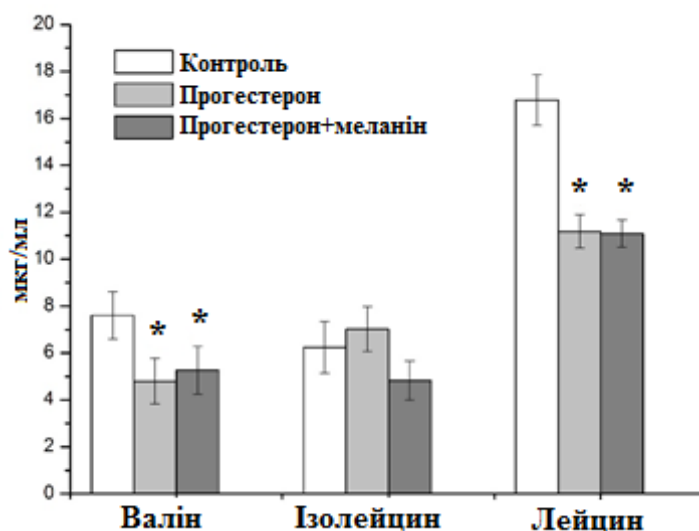


Рис. 6. Концентрації амінокислот із розгалуженим бічним радикалом (валін, лейцин, ізолейцин) у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

Отримані дані свідчать, що концентрації амінокислот із розгалуженим бічним радикалом піддаються прямому, або опосередкованому впливу під час хронічного довготривалого введення прогестерону. Результатами цього впливу є зменшення рівнів циркулюючих у крові амінокислот валіну та лейцину. Також, наші попередні дослідження показали, що рівень триптофану у мозку був підвищений у щурів із ожирінням індукованим прогестероном. Таким чином, отримані результати досліджень можуть пояснюватись тим, що знижений рівень валіну та лейцину, які конкурують із триптофаном за транспорт через гематоенцефалічний бар'єр, призводить до підвищеного рівня триптофану у мозку. Гіпотетичним наслідком, або причиною таких результатів є вплив стану ожиріння на опорно-руховий апарат тварин, так як амінокислоти із розгалуженим бічним радикалом є основними амінокислотами у білках м'язів.

На інших моделях ожиріння було встановлено, що локальне запалення у жировій тканині, що супроводжується продукцією адипокінів, хемокінів та рекрутуванням макрофагів з кров'яного русла, призводить до розвитку системного процесу [Fernández-Sánchez, 2011] і появою у крові підвищених рівнів прозапальних цитокінів [Hrabák A. et al, 2011]. Для підтвердження наявності запального процесу в цілому організмі при прогестерон індукованому ожирінні нами було визначено концентрації прозапальних (IL-1 та IFN- γ) і протизапальних (IL-10, IL-4, TGF- β) цитокінів у сироватці крові щурів.

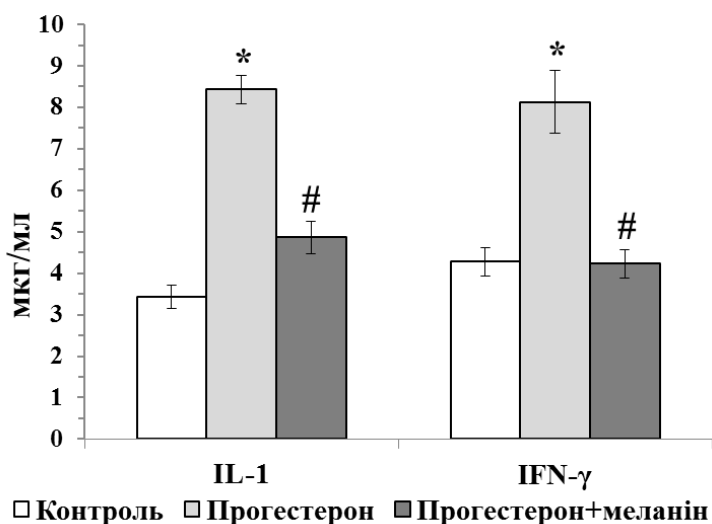


Рис. 7. Концентрації прозапальних цитокінів IL-1 та IFN- γ у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

Концентрації прозапальних цитокінів IL-1 та IFN- γ у сироватці крові щурів із ожирінням, індукованим введенням прогестерону були підвищені у 2,5 та 2,1 рази, відповідно у порівнянні із щурами контрольної групи. Це свідчить про розвиток системного запалення у відповідь на прогестерон-індуковане збільшення ваги. При подальшому лікуванні меланіном результати відновлювалися до значень, які спостерігали у контрольній групі щурів (рис. 7).

Введення прогестерону знижувало рівні протизапальних цитокінів IL-4, IL-10, TGF- β у сироватці крові щурів у 2,2, 2,2 та 2 рази, відповідно, у порівнянні з результатами контрольної групи щурів. Зниження рівнів протизапальних цитокінів сироватки крові (IL-10, IL-4, TGF- β) корелювало з підвищенням рівнів прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- γ), що також вказує на розвиток системного запального процесу. Профілактика меланіном із сумісним введенням прогестерону призвело до часткового відновлення концентрацій цитокінів IL-4 на 30%, IL-10 на 40% та TGF- β на 45%. Незважаючи на таку позитивну тенденцію, рівні протизапальних у щурів цитокінів після лікування меланіном не відновились до значень контрольної групи щурів (рис. 8).

Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними: підвищення рівня циркулюючих цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α) спостерігалось у людей та у тварин із ожирінням, а також у осіб, які страждали на супутні при ожирінні хвороби [Weisberg S., et al]. При цьому запалення при ожирінні супроводжується підвищенням рівнів інших маркерів запалення, таких як С-реактивний білок [Engeli S. et al, 2003], альбумін, фібриноген, а також рецепторів до TNF та лептину [Bullo M. et al, 2003]. Однак, попередні дані свідчать, що підвищення рівнів прозапальних цитокінів сироватки крові не корелює із їх рівнями у периферійних мононуклеарних клітинах крові, що означає, що ці клітини не могли бути джерелом цитокінів у осіб із ожирінням [Rourke R. et al, 2007].

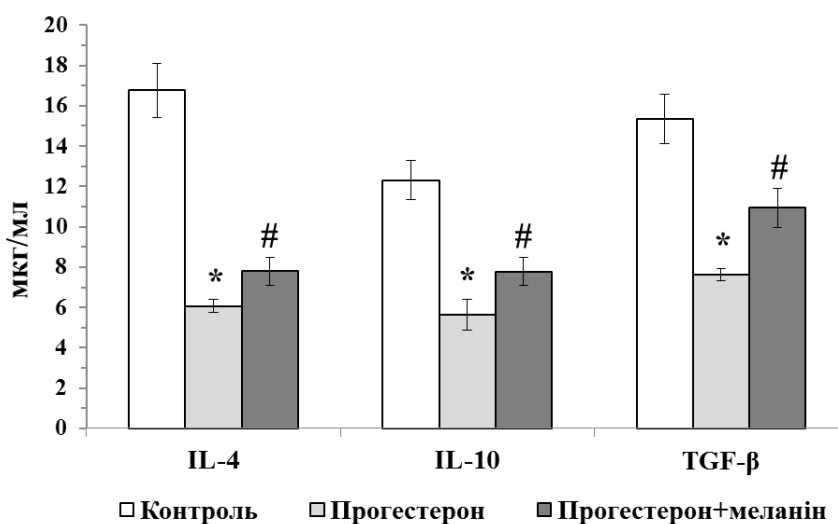


Рис. 8. Концентрації протизапальних цитокінів IL-4, IL-10 та TGF-β у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

Отже, ми показали, що при ожирінні, індукованому прогестероном, в організмі розвивається системне запалення, що проявляється у появі в крові прозапальних цитокінів. Слід очікувати, що на розвиток запалення, окрім жирової тканини, будуть відповідати інші тканини та органи. У цьому плані важливо вивчити роль не тільки макрофагів вісцеральної жирової тканини, а й перитонеальних макрофагів. Як резидентні макрофаги в черевній порожнині, ці клітини відповідають на інфекцію та запалення шляхом продукції цитокінів та хемокінів, таких як MIP-1 α та TNF- α [Ghosh, 2010].

Наявність запалення в черевній порожнині при ожирінні можна оцінити за поляризацією макрофагів. Існує ряд доказів, що поляризація макрофагів відіграє важливу роль у запальних процесах при ожирінні [Pasarica M. et al, 2009; Sun K. et al, 2013]. У попередніх дослідженнях спостерігали кореляцію між зменшенням M1 макрофагів і збільшенням M2 макрофагів у жировій тканині у людському організмі та на моделях ожиріння із використанням мишей [Spencer M. et al, 2010]. Дослідження здатності макрофагів поляризуватися по M1 або M2 фенотипу при ожирінні без екзогенних стимулюючих факторів є важливим для підтвердження того, чи локальне запалення у жировій тканині впливає на функціонування інших органів та оцінки перебігу системного запалення при ожирінні.

Для виявлення впливу довготривалого введення прогестерону та введення меланіну на поляризацію макрофагів були проведені дослідження синтезу прозапального медіатора монооксиду азоту (NO), аргіназну активність, продукцію активних форм кисню перитонеальними макрофагами.

Були визначені рівні синтезу монооксиду азоту (NO) перитонеальними макрофагами щурів контрольної групи, групи щурів, яким вводили у шлунок розчин меланіну протягом 28 днів, групи щурів, яким вводили підшкірно розчин із прогестероном протягом 28 днів та групи щурів, яким одночасно вводили розчин із прогестероном та меланіном протягом 28 днів.

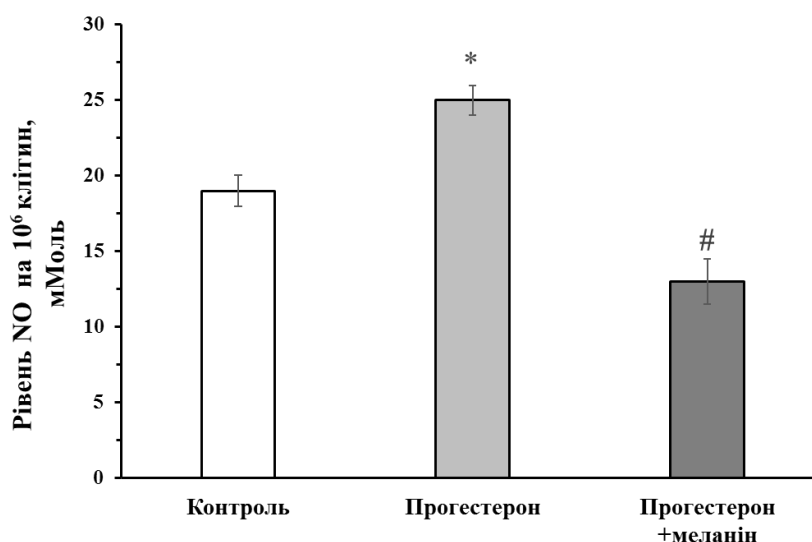


Рис. 9 Рівень монооксиду азоту (NO) в перитонеальних макрофагах щурів за умов розвитку експериментального ожиріння, індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

У ході досліджень спостерігали 45% зростання рівня NO у щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів (рис. 9). Показники рівнів NO при одночасному введенні меланіну та прогестерону щурам були у 2,15 рази менші за аналогічні показники після введення тільки прогестерону. Рівень NO цієї групи був на 50% меншим у порівнянні із показником контрольної групи. Слід зазначити, що меланін більш ефективно впливає на продукцію NO макрофагами щурів, що страждають на ожиріння ніж у здорових щурів. Ці данні показують, що перитонеальні макрофаги щурів після довготривалого введення прогестерону, із надмірною масою тіла, піддаються M1 поляризації, продукуючи більшу кількість NO.

Наступним етапом досліджень процесу запалення у щурів було визначення аргіназної активності перитонеальних макрофагів. Аргіназна активність є маркером M2 поляризації макрофагів. Збільшення її активності відображає поляризацію цих клітин у бік протизапального фенотипу [Rath M. et al, 2014]. У результаті досліджень спостерігали зменшення на 12% аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів (рис. 10A). Активність ферменту у групі прогестерон+меланін була на 28%) менша ніж у щурів після введення тільки прогестерону.

Оскільки було продемонстровано зниження активності аргінази і підвищення продукції NO перитонеальними макрофагами щурів із ожирінням, яке індуковане введенням прогестерону, можливо ці макрофаги поляризуються по M1 типу. Оскільки макрофаги поляризуються по M1 або M2 типу у відповідь на їх локальне мікро оточення, гіпотетична M1 поляризація перитонеальних макрофагів може бути результатом їх реакції на запальні молекули (наприклад, цитокіни), що виділяються із жирової тканини. В даний час широко визнано, що місцеве запалення і наступний розвиток системного запалення є обов'язковим результатом ожиріння, що корелює зі зменшенням макрофагів M2 у жировій тканині [Heilbronn L. et al, 2008].

Зниження активності аргінази також свідчить про інгібування здатності макрофагів поляризуватися у напрямку протизапального фенотипу M2. Більш того, макрофаги M2 типу не можуть бути залучені до імунної відповіді під час ожиріння, яке індуковане введенням прогестерону. Докази вказують на те, що макрофаги M2 типу не залучені до розвитку системного запалення і ці клітини переважають у худих осіб, що було показано у досліджах на мишах. [Lumeng C. et al, 2007].

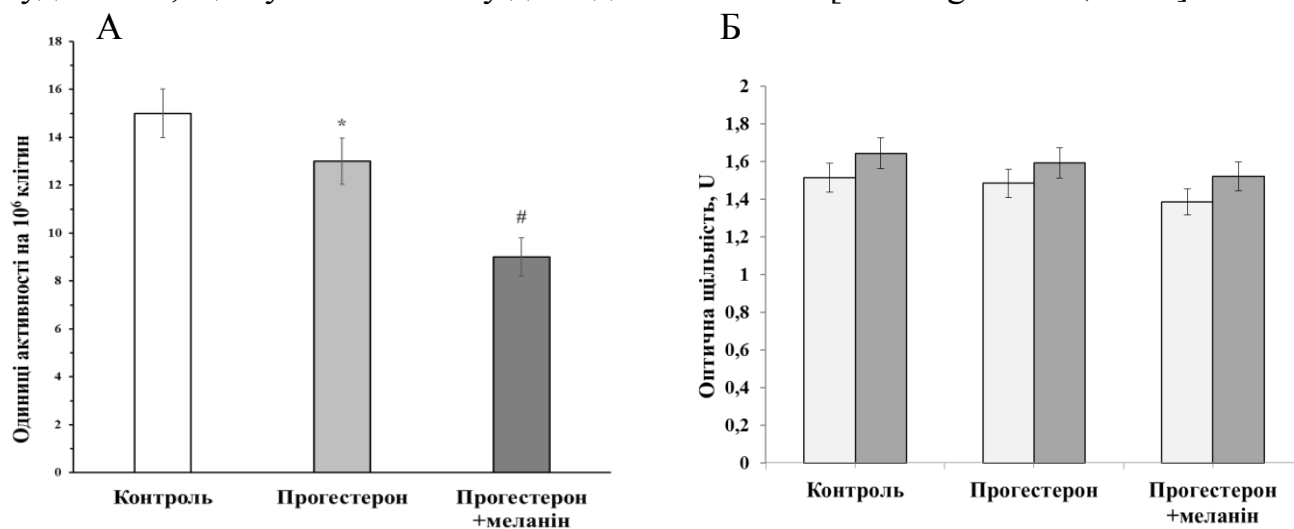


Рис. 10. Аргіназна активність(А) та рівень кисень-залежного метаболізму (Б) у перитонеальних макрофагах за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно групою Прогестерон

Невід’ємним процесом при ожирінні є оксидативний стрес. Зниження рівня антиоксидантних ферментів та джерел антиоксидантного захисту також посилює процеси окисного стресу у жировій тканині, що вважається причиною розвитку системного запалення [Amirkhizi F. et al, 2007], [Fernández-Sánchez A. et al, 2011]. Так як, активні форми кисню (АФК) є широко визнаними маркерами оксидативного стресу, є важливим їх дослідження при розвитку ожиріння після введення прогестерону. Після проведення досліджень не спостерігали різниці між показниками продукції активних форм кисню перитонеальними макрофагами щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів. Рівень АФК у щурів, яким вводили прогестерон та меланін, зменшився на 9% у порівнянні із тваринами, яким вводили лише прогестерон, але дане зменшення не є статистично значущим (рис. 10Б). Завдяки своїм антиоксидантним властивостям меланін може послаблювати продукцію активних форм кисню не тільки у жировій тканині, але і в інших клітинах, включаючи перитонеальні макрофаги, що полегшує місцеве і, отже, системне запалення.

Отже, встановлено, що меланін перешкоджає розвитку ожиріння у щурів при сумісному введенні з прогестероном, нормалізуючи органометричні параметри, усуваючи дисліпідемію та нормалізуючи вміст серотоніну в головному мозку, а також проявляючи протизапальні властивості через усунення дисбалансу між рівнями про- і протизапальних цитокінів та запобігаючи поляризації

перитонеальних макрофагів за M1 типом. Меланін може бути перспективним потенційним засобом для профілактики прогестерон-індукованого ожиріння.

Якщо розглядати меланін, як потенційний засіб для корекції ожиріння, потрібно враховувати те що, ожиріння є хронічним захворюванням і лікування меланіном потрібно проводити з довгостроковою перспективою, до появи стабільного ефекту.

Таким чином, у даній роботі було показано, що довготривале введення прогестерону щурам призводить до розвитку ожиріння внаслідок збільшення споживання корму, що супроводжується порушенням обміну серотоніну та ліпідів, а також системним запальним процесом із залученням перитонеальних макрофагів. Введення тваринам меланіну з дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X1 нормалізує основні вивчені показники, порушені при ожирінні.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети відтворено експериментальну модель ожиріння за допомогою внутрішньом'язового введення прогестерону, проаналізовано біохімічні та імунологічні показники за умов розвитку даного типу ожиріння. Досліджено вплив меланіну та стан організму за умов досліджуваного типу ожиріння.

1. Встановлено, що довготривале введення прогестерону викликає розвиток ожиріння, про що свідчить збільшення маса дослідних тварин на 27%, маси статевої жирової тканини на 70% та приріст ІМТ на 27%, це супроводжується підсиленням харчової поведінки тварин (підвищення кількості спожитого корму на 17,2%).

2. Виявлено розвиток дисліпідемії за умов розвитку прогестерон-індукованого ожиріння у щурів: підвищення рівнів триацилгліцеролів у 2 рази, ЛПНЩ – у 1,5 рази, ЛПДНЩ у 2,2 рази та зменшення рівню ЛПВЩ у 1,5 рази у сироватці крові порівняно з контрольною групою тварин.

3. Виявлено, що система обміну серотоніну залучена до розвитку прогестерон-індукованого ожиріння у щурів, що проявляється у збільшенні в головному мозку вмісту серотоніну (у 3,25 рази), амінокислот-попередників, а також зміні активності ферментів його метаболізму. Збільшення вмісту триптофану у мозку пов'язано із зниженням вмісту амінокислот з розгалуженими бічними ланцюгами (валіну, лейцину, ізолейцину) у сироватці крові.

4. Показано, що за умов розвитку ожиріння індукованого довготривалим введенням прогестерону спостерігається розвиток системного запального процесу, що проявляється у підвищенні рівня прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- γ) та зниженні рівню протизапальних (IL-4, IL-10, TGF- β) у сироватці крові щурів, посиленні поляризації макрофагів за M1 типом і пригніченні такої за M2 типом.

5. Встановлено, що меланін може попереджати розвиток ожиріння у щурів при сумісному введенні з прогестероном, модифікуючи органометричні параметри, усуваючи дисліпідемію та нормалізуючи вміст серотоніну в головному мозку, а також проявляючи протизапальні властивості через усунення дисбалансу між рівнями про- і протизапальних цитокінів та запобігаючи поляризації

перитонеальних макрофагів за M1 типом. Меланін може бути перспективним потенційним засобом для профілактики прогестерон-індукованого ожиріння.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. **Aleksandrov AV.**, Konopelniuk VV., Ishchuk TV., Ostapchenko LI. Body weight gain under long-term progesterone administration. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(6): 2429-2435. *(Особистий внесок здобувача: проведено моделювання прогестерон-індукованого, ожиріння у щурів, визначення їх маси та споживаного корму у щурів, проаналізовано літературні джерела, обробка та узагальнення результатів).*

2. **Александров АВ.**, Конопельнюк ВВ., Остапченко ЛІ. Peripheral serotonin and tryptophan levels in rats under progesterone long-term administration. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 1(20): 5-7. *(Особистий внесок здобувача: проведено визначення рівнів триптофану та серотоніну у сироватці та дванадцятипалій кишці, проаналізовано літературні джерела, оформлення рукопису).*

3. **Александров АВ.**, Конопельнюк ВВ., Іщук ТВ., Скопенко ОВ., Остапченко ЛІ. Amino acids level in rats under long-term progesterone administration. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 75-78. *(Особистий внесок здобувача: проведена підготовка сироватки крові до досліджень, проаналізовано літературні джерела, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису).*

4. **Александров АВ.**, Конопельнюк ВВ., Компанець ІВ., Остапченко ЛІ. Шлях біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів за умов експериментального ожиріння викликаного довготривалим введенням прогестерону. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Біологія. 2018; 1(75): 59-63. *(Особистий внесок здобувача: проведення частини експериментальних досліджень за темою статті, проаналізовано літературні джерела, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису).*

5. **Aleksandrov AV.**, Konopelniuk VV., Scopenko OV., Ostapchenko LI. Serum amino acids levels in rats under progesterone long-term administration and melanin treatment. Experimental and clinical physiology and biochemistry. 2018; 4(84): 5-11. *(Особистий внесок здобувача: проведена модель прогестерон-індукованого ожиріння та введення меланіну, проаналізовано літературні джерела, участь у написанні статті).*

Тези наукових доповідей

1. **Александров А.В.** Вплив довготривалого введення прогестерону на вміст серотоніну та триптофану у сироватці крові щурів / Александров А.В., Конопельнюк В.В., Остапченко Л.І. // Рівень ефективності та необхідність впливу медичної науки на розвиток медичної практики, 4-5 березня 2016р.: матер. конфер. – Київ, 2016. – С. 6-8.

2. **Александров А.В.** Основні біохімічні показники сироватки крові щурів при тривалому введенні прогестерону / Александров А.В., Конопельнюк В.В., Остапченко

Л.І. // Молодь і поступ біології –ХІІ міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 19-21 квітня 2016 р.: матер. конфер. – Львів, 2016. – С. 19.

3. **Aleksandrov A.V.** Serum amino acids levels in rats under progesterone long-term administration and melanin treatment / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Ostapchenko L.I. // Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів, 27-28 квітня 2018 р.: матер. конфер. – Львів, 2018. – С. 83-85.

4. **Aleksandrov A.V.** The of effect melanin on proinflammatory status of peritoneal macrophages of rats with progesterone-induced obesity / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Kompanets I.V., Goloborodko Ie.Ie., Svyatetska V.M., Molozhavaya O.S., Ostapchenko L.I. // Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century Taras Shevchenko National University of Kyiv. 19-20 квітня 2018.: матер.конфер. – Київ, 2018. – С. 122-123.

5. **Aleksandrov A.V.** The effects of melanin on the level of pro- and anti-inflammatory cytokines in serum of rats with progesterone-induced obesity / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Kompanets I.V., Goloborodko Ie.Ie., Ostapchenko L. I. // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum. Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine. 3-5 вересня 2018р.: матер.конфер. – Київ, 2018. – С. 100.

6. **Aleksandrov A.V.** Serotonine pathway in rat brains under long-term progesterone administration / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Kompanets I.V., Ostapchenko L.I. // Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019. Palladin Institute of Biochemistry. 21-22 березня 2019р.: Ukr. Biochem. J. 91(2) – Київ, 2019. – С. 70.

АНОТАЦІЯ

Александров А.В. Біохімічні та імунологічні показники в організмі щурів на експериментальній моделі прогестерон-індукованого ожиріння. – Кваліфікаційна 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, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню біохімічних та імунологічних показників за умов розвитку прогестерон-індукованого ожиріння та потенційного впливу на ці процеси меланіну.

Отримані результати показали, що у щурів експериментальних груп розвивалося ожиріння за умов довготривалого введення прогестерону. Про це свідчить збільшені показники маси тіла, ІМТ, кількості гонадального жиру та збільшене споживання корму. Аналіз рівнів ліпідів та ліпопротеїнів різного ступеню щільності у сироватці крові щурів за умов довготривалого введення прогестерону показав значні порушення у метаболізмі цих речовин. Також було виявлено, що система обміну серотоніну залучена до розвитку прогестерон-індукованого ожиріння у щурів. Відзначався високий рівень прозапальних цитокінів (ІЛ-1 та ІFN- γ) та низький рівень протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, TGF- β), що підтверджує виникнення системного запалення на тлі прогестерон-індукованого ожиріння у

щурів. В результаті досліджень ми спостерігали посилення продукції NO та зменшення аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів, яким вводили прогестерон, що свідчить про їх поляризацію за прозапальним M1 фенотипом.

Введення тваринам меланіну з дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X1 перешкоджає розвитку ожиріння у щурів при сумісному введенні з прогестероном, нормалізуючи органометричні параметри, вміст серотоніну в головному мозку, усуваючи дисліпідемію, а також проявляючи протизапальні властивості через усунення дисбалансу між рівнями про- і протизапальних цитокинів та запобігаючи поляризації перитонеальних макрофагів за M1 типом.

Ключові слова: ожиріння, прогестерон, меланін, імунні процеси.

АННОТАЦІЯ

Александров А.В. Биохимические и иммунологические показатели в организме крыс на экспериментальной модели прогестерон-индуцированного ожирения. –Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2019.

Диссертация посвящена исследованию биохимических и иммунологических показателей в условиях развития прогестерон-индуцированного ожирения и потенциального влияния на эти процессы меланина.

Полученные результаты показали, что у крыс экспериментальных групп развивалось ожирение при условии длительного введения прогестерона. Про это свидетельствуют увеличенные показатели массы тела, индекса массы тела, количества висцерального жира в области мочеполовой системы и потребление корма. Анализ уровня липидов и липопротеинов разной степени плотности в сыворотке крови крыс при длительном введении прогестерона показал значительные нарушения в метаболизме этих веществ. Также было определено что система обмена серотонина задействована в развитии прогестерон-индуцированного ожирения у крыс. Отмечался высокий уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 та IFN- γ) и низкий уровень противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, TGF- β), что подтверждает возникновение системного воспаления при прогестерон-индуцированном ожирении. В результате исследований мы наблюдали усиление продукции NO и уменьшение аргиназной активности перитонеальных макрофагов крыс, которым вводили прогестерон, что свидетельствует про их поляризацию по провоспалительному M1 фенотипу.

Введение животным меланина из дрожжей *Nadsoniella nigra* штаму X1 препятствует развитию ожирения у крыс при одновременном введении с прогестероном, нормализуя органометрические параметры, содержание серотонина в головном мозге, устраняя дисліпідемію, и также проявляя противовоспалительные свойства посредством устранения дисбаланса между уровнями про- и противовоспалительных цитокинов и предотвращая поляризации перитонеальных макрофагов по M1 типу.

Ключевые слова: ожирение, прогестерон, меланин, иммунные процессы.

SUMMARY

Aleksandrov A.V. Biochemical and immunological parameters of rats under experimental model of progesterone-induced obesity. - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for obtaining the Candidate of Sciences degree in Biology, specialty 03.00.04 - Biochemistry. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis is devoted to the study of biochemical and immunological parameters under the conditions of the development of progesterone-induced obesity and the potential effect of melanin on these processes.

Despite substantial progress in obesity investigation the mechanism of progesterone-induced obesity remains obscured. It's widely accepted that neuroactive steroid progesterone is the most fattening steroid hormone which can increase food intake. Today it is important to study the processes that involve in the course of obesity. It can help in the development of effective treatment. Progesterone oil solution in dose 10 mg/kg and melanin aqueous solution in dose 2 ml/kg from antarctic black yeast *Nadsoniella nigra* strain X1 were used in this paper. According to the obtained results, rats became obsessed under long-term progesterone administration. This is evidenced by increased indicators of body mass, body mass index, the amount of gonadal fat and feed intake. Moreover, analysis of the serum lipid and lipoprotein levels in rat under long-term progesterone administration showed significant disturbances in their metabolism. It was also determined that the serotonin metabolism system is involved in the development of progesterone-induced obesity in rats. There was detected a high level of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IFN- γ) and a low level of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, TGF- β), which confirms the occurrence of systemic inflammation under progesterone-induced obesity. Based on the obtained results, we observed an increase in NO production and a decrease in the arginase activity of peritoneal macrophages of rats injected with progesterone, indicating their polarization by the proinflammatory M1 phenotype.

Melanin administration prevents the development of obesity in rats under simultaneous administration of progesterone. The introduction of melanin led to normalization of body weight parameters, serotonin content in the brain, eliminating dyslipidemia, and also exhibiting anti-inflammatory properties through inhibition of inflammation by preventing peritoneal macrophages polarization by M1 type.

Key words: obesity, progesterone, melanin, immune processes.

Підписано до друку 12.11.2019 р. Зам. № 1162.
Формат 60x90 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 0,9.
Друк ЦП «КОМПРИНТ». Свідоцтво ДК №4131 від 04.08.2011 р.
м. Київ, вул. Предславинська, 28
095-941-84-99, 067-209-54-30
email: komprint@ukr.net