

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ГОЛИШКІН ДМИТРО ВІТАЛІЙОВИЧ



УДК 57.018.34:619:615:612.176

**ВПЛИВ МЕЛАНІНУ ТА НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА
СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ТА РЕАКЦІЮ КОРИ
НАДНИРНИКІВ ЗА УМОВ ДІЇ ГОСТРОГО СТРЕСУ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в НДЛ «Фармакології і експериментальної патології» ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Фалалєєва Тетяна Михайлівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
завідувач кафедри біомедицини.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Фоменко Ірина Степанівна,
Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького МОЗ України,
професор кафедри біологічної хімії.

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Руденко Анатолій Іванович,
ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України»,
завідувач НДС «Патофізіології».

Захист відбудеться **28 лютого 2018 року о 14⁰⁰ годині** на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 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 26.001.38.

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 «26» січня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38,
доктор біологічних наук



К.О. Дворщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Виразкова хвороба шлунку і дванадцятипалої кишки займає провідне місце в структурі захворювань внутрішніх органів, та реєструється приблизно у 10-20% дорослого населення [Кізлова Н.М., 2017; Юдин Б.Д., 2015; Doklestić S., 2014; El Ouali S., 2014; Xiong J., 2014]. В Україні, за даними Центру медичної статистики, захворюваність на виразкову хворобу за останні роки зросла на 38,4% [Голубчиков Ю.М., 2000; Передерій В.Г., 2017; Харченко Н.В., 2015; Степанов Ю.М., 2010, 2013, 2015]. В нашій країні первинна інвалідизація хворих виразковою хворобою складає в середньому 17,1 % від усіх гастроентерологічних захворювань [Передерій В.Г., 2017; Степанов Ю.М., 2014, 2015]. Зростання відсотку хворих на цю патологію пов'язано, насамперед, із впливом психоемоційного стресу на організм людини, який є одним з головних етіологічних факторів, що призводить до розвитку виразкової хвороби та є невід'ємною частиною життя. Ця невтішна статистика не враховує гастропатії викликані нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП). НПЗП-гастропатії – ерозивно-виразкові ураження гастродуоденальної зони, пов'язані з прийманням НПЗП, які часто використовують в клінічній практиці лікарі широкої спеціалізації. Відповідно до офіційної статистики, що ґрунтується на рецептурній видачі препаратів, щодня в світі понад 30 млн людей приймають НПЗП, а серед людей старших за 65 років НПЗП застосовують 10-20 % [Степанов Ю.М., 2010]. Наразі неконтрольоване застосування НПЗП продовжує зростати [Melcarne L., 2016; Rashid. S., 2016].

На сьогодні існує низка ефективних фармакологічних препаратів для лікування виразкової хвороби, насамперед, інгібітори протонної помпи, блокатори H_2 -гістамінових рецепторів та ін. [Gisbert J.P., 2011; Hunt R.H., 2015]. Вказані засоби мають обмежене значення для профілактичного застосування (політравми, інфаркт міокарда) у зв'язку з побічною дією [Kurata J. H., 1997; Maes M., 2017; Metz D., 2002; Tagkalidis P., 2002; Tarnawski A. S. 2012]. Аналіз літератури показує, що для профілактики найчастіше використовують різноманітні фітопрепарати [Graziani G., 2005; Sumbul S., 2011] та фітоконцентрати [D'Argenio G., 2008; Pastene E., 2010; Raturi G., 2014] з антиоксидантною дією, яку забезпечують різні біологічно-активні сполуки, насамперед, поліфенольної природи [Farzaei et al., 2015; Sen S. et al., 2013; Sharma A. V. et al., 2012]. До таких сполук належить меланін, продуцентом якого є антарктичні мікроорганізми *Pseudonadsoniella brunea* (раніше *Nadsoniella nigra* X-1). Меланін, зазначеного походження, являє собою поліфенолкарбоновий комплекс [D'Ischia M., 2015; Micillo R., 2016]. Він володіє не лише потужною антиоксидантною, але і антибактеріальною, протизапальною, цитопротективною дією [Савицький Я.М., 2002; Arun G., 2015; Meredith P., 2006]. Подібні ефекти притаманні й іншій біодоступній наносполуці – наночастинкам діоксиду церію (НДЦ) [Ji Y.J., 2000; Korsvik C., 2007; Wei H., 2013]. Ми припустили, що меланін та НДЦ будуть ефективними у профілактиці ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунку (СОШ), викликаних дією стресу за Сельє. Вказана модель стресу є найбільш наближеною до природних умов і поєднує в собі елементи емоційного та фізичного стресу та рекомендована Державним експертним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів

[Стефанов О.В., 2001]. У літературі є поодинокі роботи про позитивний вплив меланіну при ураженнях СОШ [Савицький Я.М., 2002; Чижанська Н.В., 2008], викликаних різними чинниками (серотонінова, етанолова, норадреналінового та іммобілізаційна моделі виразкоутворення), та відсутні дані про вплив НДЦ на СОШ за дії стресу. Таким чином, актуальність роботи полягає в необхідності дослідження нових засобів профілактики стрес-індукованих уражень шлунку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках наукових тем Відділення біологічних та біомедичних технологій НДЛ «Фармакології і експериментальної патології» ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Доклінічне дослідження підгострої токсичності меланіну, виділеного з антарктичних мікроорганізмів» № 13ДФ036-04 (державний реєстраційний номер 0113U006059) та «Доклінічні дослідження токсичності меланіну – субстанції для нових лікарських препаратів та ефективності дерматотропних препаратів на основі наночастинок» № 16БП036-04 (державний реєстраційний номер 0116U004828), а також за підтримки та на замовлення Держінформнауки ДУ «Національний антарктичний науковий центр» Міністерства освіти і науки України №Н/6-2012 (12ДФ036-08) від 01 серпня 2012 р. «Визначення механізму профілактично-лікувальної дії біологічно активних речовин, виділених з антарктичних організмів» (державний реєстраційний номер 0112U004870).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати вплив меланіну та НДЦ на стан СОШ та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресу викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1) Встановити стреспротективну дію меланіну та НДЦ (вплив на ерозивно-виразкові ураження СОШ, коефіцієнт маси органів стрес-протекторної системи тимусу і наднирників, вміст вільних оксипроліну, фукози та гексуранових кислот) за умов нервово-м'язового напруження за Сельє.

2) Охарактеризувати антиоксидантні властивості меланіну та НДЦ (вплив на концентрацію первинних, вторинних та кінцевих продуктів перикисного окиснення ліпідів (ПОЛ), а також активність ферментів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) в СОШ щурів за умов стресу.

3) Встановити антизапальні властивості меланіну та НДЦ (показники лейкоцитарної формули крові, концентрація про- та антизапальних цитокінів) на тлі моделювання стресу.

4) З'ясувати вплив меланіну на концентрацію адренкортикотропного гормону (АКТГ) та кортизолу в сироватці крові щурів за умов дії стресу.

5) Охарактеризувати дію меланіну на електричні характеристики модельних біліпідних мембран.

Об'єкт дослідження – стрес-індуковані зміни в організмі щурів.

Предмет дослідження – процеси цитоураження та цитопротекції, стан окисно-антиоксидантної рівноваги, маркери запалення.

Методи дослідження. Фізіологічні (вплив стресу на організм), біофізичні (електричні характеристики біліпідних мембран), біохімічні (визначення вмісту ПОЛ та активності антиоксидантних ферментів), імуноферментні (визначення

концентрації гормонів та цитокінів), гематологічні (підррахунок лейкоцитів) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота була скерована на пошук нового ефективного стреспротектора. Розширено розуміння фізіологічних механізмів цитопротективної дії меланіну та НДЦ. Обидві сполуки знижують прояви ерозивно-виразкових уражень, викликаних моделюванням стресу. Вперше продемонстровано, що при профілактичному введенні, меланін та НДЦ попереджають формування продуктів деградації СОШ за показниками вільного оксипроліну, фукози та гексуранової кислоти, що є основою слизового бар'єру. Вперше встановлено імунпротективний ефект меланіну та НДЦ за показниками лейкоцитарної формули крові, а також станом про- та антизапальних цитокінів крові за умов дії гострого стресу викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє.

Оскільки меланін виявився більш ефективним цитопротектором, автор продовжив більш детально з'ясовувати механізм його дії. Досліджено механізм проникнення меланіну через центральну гідрофобну зону клітинних мембран модельних бімолекулярних ліпідних мембран. Показано, що меланін знижує гіперактивацію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи за умов дії стресу, що підтверджується відновленням рівня кортизолу та АКТГ та зменшенням маси наднирників.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати свідчать про цитопротективну дію меланіну та НДЦ за умов стресу. Такі препарати можуть слугувати ефективними засобами для профілактики і лікування наслідків екологічних та техногенних катастроф, бойових дій, оперативних і стоматологічних втручань. Вони можуть використовуватися як допоміжні засоби в умовах, що викликають психоемоційний стрес та напруження механізмів адаптації.

Особистий внесок здобувача. Аналіз літератури, проведення експериментів, статистична обробка та написання дисертації виконані здобувачем самостійно. Встановлення мети та завдань досліджень, планування експерименту, формулювання висновків та написання наукових публікацій здійснено за участю наукового керівника. Дослідження з вивчення властивостей меланіну проводились за консультативною допомогою д.б.н., проф. Берегової Т.В. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка). НДЦ для експериментальних досліджень був люб'язно наданий членом-кореспондентом НАНУ, проф., д.б.н. Співаком М.Я. (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Біохімічні дослідження проводились за консультативною допомогою д.б.н., с.н.с. Дворщенко К.О., д.б.н., с.н.с. Савчука О.М. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка) та д.м.н., проф. Непоради К.С. (ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»). Біофізичні дослідження мембранотропних властивостей меланіну проводилися за консультативною допомогою д.б.н., проф. Рибальченко В.К. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка). Автор висловлює вдячність всім колегам за надану допомогу та їх участь відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені і обговорені на V Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2009); XIV Міжнародній медичний конгрес студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2010); VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2011); V Міжнародна Антарктична Конференція "Антарктика і глобальні системи землі: нові виклики та перспективи" (Київ, 2011); III Международная научно-практическая конференция «Достижения молодых ученых в развитии инновационных процессов в экономике, науке, образовании» (Брянск, Російська Федерація, 2011); 4th International Scientific Conference "Advances in pharmacology & pathology of the digestive tract" (Київ, 2012); VII Міжнародна конференція молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери" (Харків, 2012); IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2013); VI Міжнародна Антарктична Конференція "Інтерналізація досліджень в Антарктиці – шлях до духовної єдності людства" (Київ, 2013); II Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження 2014» (Київ, 2014); XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2015); VII Міжнародна Антарктична Конференція "Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети" (Київ, 2015); Науково-практична конференція «Пробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (Київ, 2015); Міжнародна конференція «Зимові наукові читання» (частина 2) (Київ, 2016); Advanced Lecture Course «Molecular basis of human disease» (2016, о. Спецес, Греція); VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 22 наукові праці, з яких 7 статей, серед яких 5 рекомендовано ДАК України та 3 належать до наукометричної бази даних «Scopus», 15 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу результатів дослідження та їх обговорення, розділу присвяченому аналізу і узагальненню результатів, висновків та списку використаних літературних джерел. Робота викладена на 170 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 18 рисунками та 5 таблицями. Перелік використаних літературних джерел складається з 276 найменувань, з них кирилицею – 32, латиницею – 244.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, у відповідності до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та згідно з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996). Експерименти

виконували на білих нелінійних щурах масою 180-220 г. Тварин утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні в індивідуальних клітках. Усього в експериментах було використано 130 щурів.

Метод нервово-м'язового напруження за Сельє. Стресові ураження викликали методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Вказаний метод рекомендований Державним фармакологічним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів [Стефанов О.В., 2001]. Щурів іммобілізували на операційному столику на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Тривалість іммобілізації складала 3 год. Через 2 год після припинення знерухомлення тварин умертвляли за допомогою цервікальної транслокації.

Групи тварин з дослідження впливу меланіну за умов дії стресу. Продуцентом меланіну, використаного в наших дослідженнях, є антарктичні мікроорганізми *Pseudonadsoniella brunea* (раніше *Nadsoniella nigra* X-1), що були висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська Антарктична станція академік Вернадський).

Щури були розділені на 3 групи: 1 група (контроль) – інтактні тварини, яким перед початком досліду вводили воду; 2 група (стрес+вода) – щури, яким перед моделюванням стресу вводили 2,9 мл/кг води; 3 група – щури, яким перед моделюванням стресу вводили розведений у воді меланін в дозі 5 мг/кг розведеного у воді об'ємом 2,9 мл/кг. Введення води та меланіну проводили за 30 хв до початку моделювання стресу внутрішньошлунково (в.ш) (n=90).

Групи тварин з дослідження НДЦ за умов дії стресу. НДЦ синтезовано у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів ІМВ ім. Д.К. Заболотного НАН України за методикою Іванова та Співака [Ivanova O.S., 2011].

Тварини були розділені на 4 групи: 1 група – інтактні тварини (контроль), 2 група (стрес+вода) – тварини, які отримували 2,9 мл/кг води, 3 група – щури, яким вводили 2,9 мл/кг стабілізуючого розчину (цитрат натрію), та 4 група – тварини, які отримували НДЦ в дозі 1 мг/кг, розведеного в стабілізуючому розчині об'ємом 2,9 мл/кг [Жолобак Н., 2009]. Всі речовини вводили двома способами: при одноразовому введенні – за 30 хв перед початком досліду та при 10-ти денному – упродовж 10 діб, один раз на добу в.ш. На 10-ту добу, через 30 хв після останнього введення тварин піддавали дії стресу. 10-ти денне введення препарату було обумовлене неефективністю одноразового введення та попередніми дослідженнями [Ефименко Е.Ю., 2015].

Забір біологічних зразків. В результаті проведених дослідів було проаналізовано наступні біологічні зразки: тимус, надниркові залози, гомогенат СОШ та сироватку крові.

Забір органів. При заборі тимусу і наднирників їх зважували. Коефіцієнт маси (КМ) тимусу та надниркових залоз обчислювали за формулою: $KM = \text{маса органа (мг)} / \text{маса тіла тварини (г)} \cdot 100$ [Стефанов О. В., 2001].

Забір крові у щурів. Для визначення вмісту кортизолу та АКТГ розрізали грудну клітку, відкривали доступ до серця, яке ще продовжувало скорочуватися, і за допомогою шприца набирали 3-5 мл крові. Кров щурів збирали в пробірки без

гепарину, відстоювали і центрифугували при 1000 g протягом 20 хв. Після чого здійснювали відбір сироватки крові.

Для приготування мазків краплю крові отримували після нанесення насічок на вухах або хвості. Для отримання більшої кількості крові використовували метод обрізання хвоста. Після обрізання хвоста кров з рани наносили на предметне скло. Після забору крові рану на хвості обробляли розчином перекису водню для знезараження рани та зупинки кровотечі [Меньшиков В.В., 1987].

Макроскопічний аналіз шлунку. Шлунок, розрізали по малій кривизні, вивертали слизовою назовні та промивали, на гастроскопі при транслюмінаційному освітленні за допомогою лупи ($\times 4$) проводили ретельний огляд СОШ. Диференційно підраховували площу виразок та довжину ерозій.

Приготування гомогенатів СОШ щурів. Протягом 3-5 хв здійснювали інтенсивне механічне відділення СОШ на чашці Петрі за допомогою хірургічних інструментів. В скляному гомогенізаторі Поттера із тефлоновим поршнем готували 10% гомогенат СОШ на 0,1 М фосфатному буфері (рН=7,4). Тканину гомогенізували до однорідного стану та фільтрували через нейлоновий фільтр для видалення не повністю зруйнованих клітин та ядер. Пухкий осад відкидали. Усі маніпуляції пов'язані із забором матеріалу та приготуванням гомогенатів тканин здійснювали при температурі від 0 до $+4^{\circ}\text{C}$.

Визначення продуктів катаболізму білків СОШ і пристінкового слизу шлунку. У гомогенаті СОШ визначали вміст вільного оксипроліну [Тетянець С.С., 1985] і фукози [Шараев П.Н., 1997] спектрофотометричним методом, гексуринових кислот флуориметричним методом [Шараев П.Н., 1987].

Біохімічні дослідження. В гомогенаті СОШ визначали вміст шиффових основ флуориметричним методом [Колесова О.Е., 1984], дієнових кон'югатів за УФ-поглинанням гептанових екстрактів [Гаврилов В.Б., 1988], ТБК-активних продуктів [Орехович В.Н., 1977] та вміст пероксиду водню [Gay С.А. 2003] спектрофотометричним методом. Активність ферментів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази (СОД) [Чевари С., 1985] і каталази (КАТ) [Корольок М.А., 1988] визначали спектрофотометричним методом.

Гематологічний аналіз. *Лейкоцитарна формула крові.* Підготовка та фарбування мазків крові щурів здійснювалося за допомогою барвника Романовського та барвника-фіксатора Май-Грюнвальда. Підрахунок лейкоцитарної формули проводили по лінії «меандра», від краю мазка [Любина А. Я., 1984]. Підрахунок кількості лейкоцитів, зафарбованих метиленовим синім, проводили в камері Горяєва у 25 великих квадратах [Меньшиков В. В., 1987]. Гематологічні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus ВХ-41.

Аналіз вмісту цитокінів в сироватці крові щурів. Для визначення ІЛ-4 та ІЛ-10 використовували мишині моноклональні антитіла (Sigma), для ІЛ-12В р40 – поліклональні антитіла кроля (Sigma), для ІЛ-1 β та ІНФ- γ – поліклональні антитіла кози (Sigma). Імуноферментний аналіз проводили у мікропланшетах із сорбційною здатністю за стандартною методикою для розчинних білків [Crowther J. R., 2009].

Визначення вмісту гормонів стресу. Для визначення вмісту кортизолу у сироватці крові щурів використовували метод імуноферментного аналізу за допомогою комерційного набору виробництва ТОВ НВЛ «Гранум» (м. Харків).

Визначення вмісту АКТГ проводили методом імуноферментного аналізу за допомогою комерційних наборів виробництва DRG International Inc. (USA).

Метод визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран. Визначення впливу меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран виконувалося за аналізом нестационарних циклічних вольт-амперних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран [Mueller P., 1962].

Статистична обробка даних. Нормальність розподілу одержаних результатів перевіряли на за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. При нормальному розподілі порівняння вибірок проводили за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. При розподілі відмінному від нормального використовували непараметричний метод Манна-Уїтні. Розраховували середнє значення (M), похибку середнього значення (m). Для аналізу даних приймали рівень значущості $p < 0,05$ [Гланц С., 1999].

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження впливу меланіну та НДЦ на розвиток уражень в СОШ за умов нервово – м'язового напруження. Стрес викликав ерозивно-виразкові ураження в СОШ щурів, (площа виразок – $9,5 \pm 2,4$ мм², довжина ерозій – $14,5 \pm 2,4$ мм з розрахунку на один шлунок). У групі щурів, яким за 30 хв до початку дії стресу вводили меланін, площа виразок була меншою на 64 % ($p < 0,05$) (рис. 1). Стосовно ерозій, спостерігалася лише тенденція до їх зменшення.

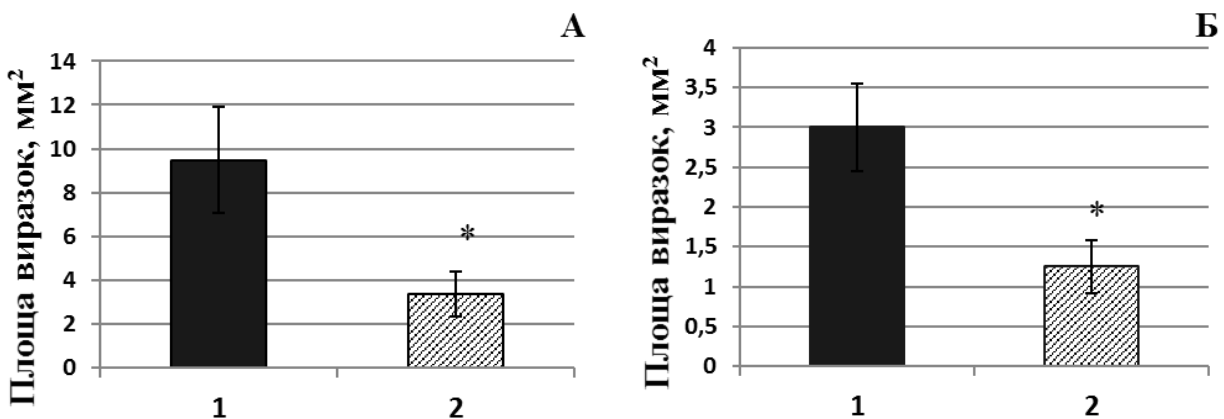


Рис. 1. Площа виразок у СОШ щурів після дії нервово-м'язового напруження та за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг, в.ш (А) та НДЦ в дозі 1 мг/кг, в.ш (Б), ($M \pm m$): 1-стрес+вода ($n=10$), 2-вплив досліджуваних речовин за умов дії стресу ($n=10$); * $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів стрес+вода.

Отримані дані узгоджуються з результатами Чижанської та спів. (2005) де дослідники показали гастропротективний вплив меланіну з дріжджів *Nadsiniella nigra var. hesuelica*. Такий вплив можна пов'язати з підвищенням концентрації нітрогену оксиду (NO) та ендотеліальної синтази нітрогену оксиду (eNOS) в крові за умов профілактичного введення меланіну.

Профілактичне введення НДЦ зменшувало площу виразок на 41,7% ($p < 0,05$), порівняно з групою щурів стрес+вода (рис. 1). При введення НДЦ відмічалася лише тенденція до зменшення ерозій. Наші дані узгоджуються, з дослідженнями де автори

показали гастропротективний вплив НДЦ за умов моделювання оксидативного стресу викликаного етаноловою моделлю ульцерогенезу [Prasad R.G.S.V., 2013]. Оксидативний стрес та генерація активних форм кисню (АФК) є спільною ознакою, що об'єднує механізми виразкоутворення більшості стрес-моделей [Franke A., 2005, Tarnawski A., 2014]. Здатність НДЦ захищати слизову оболонку травного тракту від оксидативного стресу пов'язують з наявністю Se^{3+} та Se^{4+} іонів на його поверхні, які є основою його КАТ-СОД-міметичної активності та здатності зв'язувати АФК, що виникають за умов оксидативного стресу [Celardo I., 2011; Nelson B., 2016].

Визначення впливу меланіну та НДЦ на зміну маси органів стрес протективної системи. Моделювання іммобілізаційного стресу супроводжувалося гіпертрофією наднирникових залоз (НЗ) та інволюцією тимусу. При вивченні стреспротективних властивостей меланіну, приріст коефіцієнту маси НЗ у групі стрес+вода склав 46% ($p < 0,001$), тоді як коефіцієнт маси тимусу зменшився на 26% ($p < 0,001$) у порівнянні з показниками контролю. У групі щурів, яким до початку дії стресу вводили меланін, коефіцієнт маси тимусу та НЗ не відрізнявся від контрольних значень. При вивченні стреспротективних властивостей НДЦ гіпертрофія НЗ щурів групи стрес+вода склала 25% ($p < 0,05$) коефіцієнту маси, тоді як зменшення коефіцієнту маси тимусу становила 23% ($p < 0,05$) в порівнянні з інтактними тваринами. Введення НДЦ знижувало коефіцієнт маси НЗ на 22% ($p < 0,05$) і призводило до збільшення маси тимусу на 23,6% ($p < 0,05$) порівняно з групою стрес+вода. Даний вплив можна пов'язати з стресадаптогенними та антиоксидантними властивостями обох сполук.

Стан слизового бар'єру шлунку за умов нервово-м'язового напруження та профілактичного введення меланіну та НДЦ. Під час запального процесу у зоні ураження СОШ підвищується синтез прозапальних цитокінів. Вони активують трансформацію фібробластів сполучної тканини у міофібробласти, сприяють ангіогенезу та наступному реепітелізаційному процесу [Reinke J. M., 2012]. Активація імунної відповіді й запального процесу збільшує системний вміст глюкокортикоїдів, що зумовлює зниження утворення колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу, тоді як їх наявність в СОШ у вільній формі може вказувати на патологічні зміни слизової оболонки. За таких умов відбувається руйнування СОШ, що виявляється у зростанні концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуронових кислот [Hasebe T. 1987; Skrupnyk I.M., 1999]. При введенні меланіну вміст вільного оксипроліну в СОШ знижувався на 29% ($p < 0,001$), тоді як введення НДЦ зменшувало його вміст на 16% ($p < 0,001$) порівняно з групою стрес+вода. Відмічалось достовірне зменшення вмісту вільної фукози в пристінковому слизі після введення меланіну стресованим щурам на 16% ($p < 0,001$) та після введення НДЦ на 14% ($p < 0,05$) порівняно з відповідними групами стрес+вода. При профілактичному введенні меланін чинив захисний вплив на СОШ, що підтверджувалося зменшенням вмісту вільних гексуронових кислот на 24% ($p < 0,001$) порівняно з щурами, яким перед нанесенням стресу вводили воду (рис. 2).

У тварин, яким було введено НДЦ (рис.2) рівень гексуронових кислот знижувався на 28,7% ($p < 0,001$) у порівнянні з групою стрес+вода. Отже, профілактичне введення меланіну та НДЦ попереджувало деполімеризацію колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу СОШ, свідченням чого є

зменшення відповідно концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуранових кислот. При цьому цілісність слизового бар'єру була наближеною до значень контрольних щурів, що узгоджується з результатами макроскопічного аналізу СОШ.

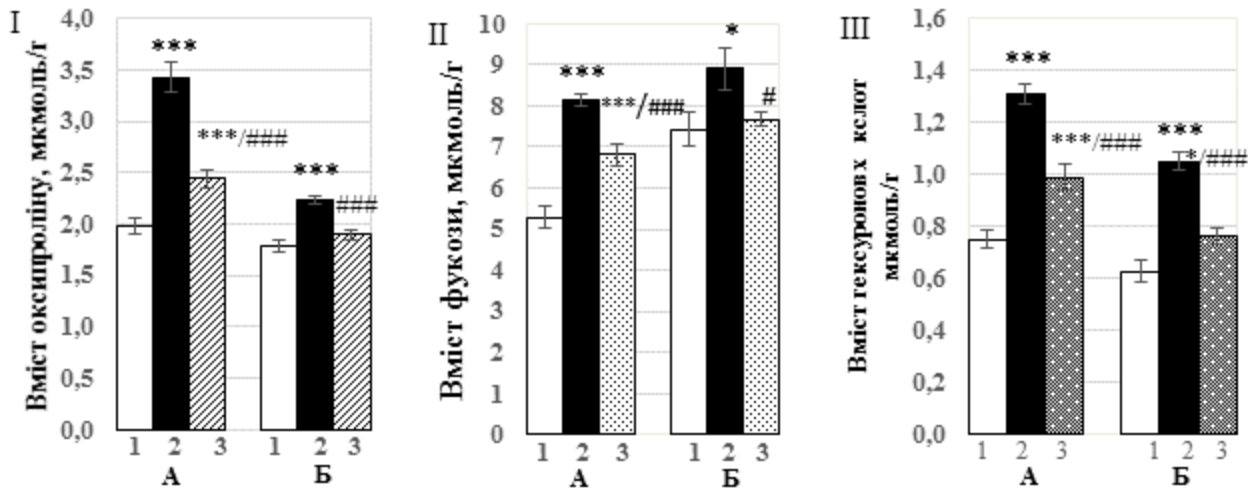


Рис. 2. Вміст вільного оксипроліну (I), фукози (II) і гексуранових кислот (III) в пристінковому слизі шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг, в.ш (А) та НДЦ в дозі 1 мг/кг, в.ш (Б) ($M \pm m$): 1-контроль ($n=10$), 2-стрес+вода ($n=10$), 3- вплив досліджуваних речовин за умов дії стресу ($n=10$); * $p < 0,05$ у порівнянні з контролем, *** $p < 0,001$ у порівнянні з контролем; # $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, що підлягали стресу ### $p < 0,001$ у порівнянні з групою щурів, що підлягали стресу

Активування ангіогенезу та синтезу колагену в тканинах шлунку є одними з основних молекулярних механізмів дії поліфенольного комплексу на прикладі куркуміну. Цей вплив опосередковується через регуляцію фактору росту ендотелію судин, підвищення експресії матричної металопротеїнази, відповідальних за будівництво екстрацелюлярного матриксу СОШ (колагенових волокон) [Sharma A.V., 2012]. В свою чергу, вплив НДЦ пов'язують з прискоренням загоєння уражених ділянок СОШ шляхом посилення міграції і проліферації фібробластів, що виробляють більшість з вищенаведених компонентів екстрацелюлярного матриксу [Tracy L.E., 2014].

Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан перекисного окиснення ліпідів. Нині є загальновизнаним, що розвиток оксидативного стресу є універсальним неспецифічним механізмом клітинного пошкодження при різних захворюваннях [Adly A.M., 2010]. В СОШ щурів через 2 год після дії стресу рівень дієнових кон'югатів (ДК) зростав на 63% ($p < 0,05$). У щурів, яким перед дією стресу вводили меланін, рівень ДК в СОШ не відрізнявся від контрольних значень. При визначенні проміжних продуктів ПОЛ (ТБК-активних продуктів) у СОШ щурів, які підлягали дії стресу реєструвалося збільшення утворення ТБК-активних продуктів на 98,5% ($p < 0,05$). Введення щурам меланіну перед нанесенням стресу усувало зростання рівня ТБК-активних продуктів в СОШ. Через 2 год після дії стресу рівень шиффових основ досягав значення, що перевищувало показник в контролі на 82% ($p < 0,05$). У щурів, яким перед моделюванням стресу вводили меланін, рівень

шиффових основ не відрізнявся від контрольних значень. Отримані дані доводять наявність антиоксидантних властивостей меланіну.

Порівнюючи властивості меланіну з НДЦ було встановлено, що введення наносполуки зменшувало вміст дієнових кон'югатів на 19,15% ($p < 0,05$), ТБА-активних продуктів на 25% ($p < 0,05$), та шиффових основ на 24,4% ($p < 0,05$) в СОШ у порівнянні з групою стрес-вода.

Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан антиоксидантної системи щурів. Важливими ферментами антиоксидантної системи є СОД, яка перетворює супероксидний радикал у перекис водню та КАТ, яка інактивує утворений з СОД пероксид водню [Kwiecien S., 2014]. Встановлено, що за умов дії іммобілізаційного стресу, у гомогенаті СОШ щурів активність СОД зростала на 29% ($p < 0,05$), а КАТ на 37% ($p < 0,05$) відносно контролю.

Профілактичне введення меланіну щурам, що підлягали впливу стресу сприяло збільшенню активності СОД ($p < 0,05$), при цьому рівень КАТ був в межах контрольних значень ($p < 0,05$). Дослідження поліфенольних сполук підтверджують отримані нами результати. Так антиоксидантна активність аллілпірокатехолу та епігалокатехіну обумовлена зниженням продукції АФК моноцитами та макрофагами, а також пригнічення прозапального АФК/NF-кБ шляху в тканинах шлунку [Yadav S., 2013].

При порівнянні антиоксидантних властивостей меланіну та НДЦ було показано, що активність СОД у групі введення НДЦ зросла на 29,4% ($p < 0,05$) тоді як активність КАТ знизилась на 35,3% ($p < 0,05$) відповідно до показників групи стрес-контролю. Ці результати можуть бути пов'язані з СОД-КАТ-міметичними властивостями НДЦ. Як раніше зазначалося, НДЦ з рівнем окислення (Se^{3+}), демонструє СОД-подібну активність, що імітує тим самим каталіз дисмутації супероксидрадикалу аніону в живих клітинах [Heckert E.G., 2008].

Вплив меланіну та НДЦ на лейкоцитарну формулу крові щурів. Показники лейкоцитарної формули крові є важливими додатковими методами дослідження захворювань різної етіології, у тому числі й патологій, що викликані дією стресу на організм («психосоматичні захворювання») [Krag M., 2015; Khalsa D.S., 2015]. Профілактичне введення меланіну призводило до зменшення показника паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів на 39% ($p < 0,01$) та 20% ($p < 0,01$) відповідно до групи стрес+вода. Вміст лімфоцитів у групі щурів, яким перед нанесенням стресу вводили меланін, відновлювався на 27% ($p < 0,05$) відносно групи стрес+вода. Дійсно в роботах авторів [Yadav S. K., 2012] підтверджено вплив поліфенольних сполук на інгібування інфільтрації лейкоцитів, а також їх взаємодію з шаром ендотелію через супресію молекул адгезії (E-селектин, P-селектин і судинний комплекс адгезії VCAM-1), що зменшує запальну реакцію в СОШ. При встановленні протизапальних властивостей НДЦ, після моделювання стресу, було відзначено збільшення відсотку паличкоядерних нейтрофілів на 280% ($p < 0,05$) і сегментованих нейтрофілів на 237,5% ($p < 0,05$) і зменшення відсотку лімфоцитів у крові щурів на 64% ($p < 0,05$). Профілактичне введення НДЦ знижувало відсоток паличкоядерних нейтрофілів на 58% ($p < 0,05$) і відсоток сегментоядерних нейтрофілів на 22,3% ($p < 0,05$). У групі НДЦ було показано збільшення відсотка лімфоцитів на 58,2% ($p < 0,05$) порівняно з групою стрес+вода. Отримані результати

свідчать про ослаблення запального процесу під впливом тестованих сполук в умовах стресу. Отже, профілактичне введення меланіну та НДЦ призводить до зменшення запальної реакції організму щурів.

Вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов нервово-м'язового напруження та введення меланіну та НДЦ.

Вміст прозапальних цитокінів. Ушкодження СОШ за умов дії стресу викликає запалення та призводить до активації імунної відповіді. У першу чергу включаються регуляторні Т-лімфоцити – Т-хелпери 1 типу, які підвищують активність макрофагів [Hsu D.-Z., 2013]. Останні продукують прозапальні цитокіни – інтерферон (ІНФ) - γ , інтерлейкіни (ІЛ)– ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6 та ін. Дані прозапальні цитокіни посилюють уражуючий вплив стресу на СОШ. Встановлено, що в результаті дії стресу, в сироватці крові щурів зростає вміст прозапальних цитокінів. Так, у групі стрес+вода рівень ІЛ-1 β перевищував контрольні показники на 34,7% ($p < 0,001$), а ІЛ-12В р40 на 27,9% ($p < 0,01$) (рис. 3).

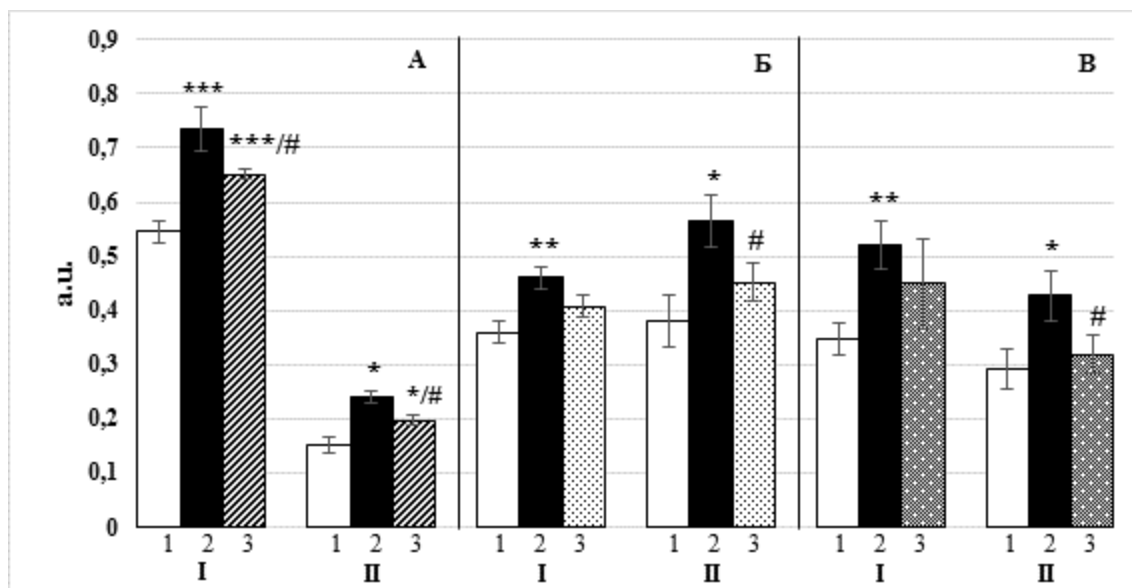


Рис 3. Рівень прозапальних цитокінів ІЛ-1 β (А), ІЛ-12В (Б) р40, ІНФ- γ (В) у сироватці крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг, в.ш (І) та НДЦ в дозі 1 мг/кг, в.ш (ІІ) ($M \pm m$): 1-контроль ($n=10$), 2-стрес+вода ($n=10$), 3-стрес і досліджувана речовина ($n=10$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ та *** $p < 0,001$ у порівнянні з контролем, # $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, що підлягали дії стресу.

У сироватці крові щурів після стресу значно збільшувався вміст ІНФ- γ порівняно з інтактним контролем ($p < 0,01$). Меланін, зменшував вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів. Так, рівень ІЛ-1 β знижувався на 11,5% ($p < 0,05$) щодо групи стрес+вода (рис. 3). Рівень ІЛ-12В р40 зменшувався до рівня інтактних щурів, проте значущо не відрізнявся від групи стрес+вода. Подібні результати були виявлені щодо вмісту ІНФ- γ : даний цитокін, при введенні меланіну, значущо не відрізнявся як від групи інтактного контролю, так і стрес+вода (рис. 3).

При дослідженні антизапальних властивостей НДЦ, показано, що профілактичне введення НДЦ зменшувало рівень ІЛ-1 на 21% ($p < 0,05$) та ІЛ-12В р40

на 20% ($p < 0,05$) у порівнянні з групою стрес+вода (рис. 3). Вміст INF- γ у сироватці крові щурів з стрес-індукованими ураженнями на 44,82% ($p < 0,05$) був більшим порівняно з інтактними щурами. Профілактичне введення НДЦ характеризувалося зниженням рівня INF- γ на 26,2% ($p < 0,05$) (рис. 3).

Вміст антизапальних цитокінів. При дослідженні рівня антизапальних цитокінів IL-4 та IL-10, TGF- β після дії стресу встановлено, що вміст IL-4 та TGF- β підвищувався на 16,1% ($p < 0,05$) та 48% ($p < 0,01$) щодо інтактного контролю (рис. 4). Це може бути компенсаторною реакцією імунної системи у відповідь на запальну реакцію за умов стресу. Вміст IL-10 в сироватці крові щурів одразу після дії стресу не змінювався. За умов введення меланіну вміст IL-4 в групі стрес+меланін був більшим на 22,3% ($p < 0,05$) щодо групи стрес+вода та на 42,1% ($p < 0,01$) щодо інтактного контролю (рис. 4). Меланін також підвищував показники вмісту IL-10 на 27,1% ($p < 0,05$) порівняно з групою стрес+вода і на 21,1% ($p < 0,01$) порівняно з інтактним контролем. Найбільш значний вплив меланін здійснював на вміст TGF- β . В групі стрес+меланін цей показник був меншим на 23,0% ($p < 0,05$) порівняно з групою стрес+вода та не відрізнявся від рівня інтактних щурів (рис. 4).

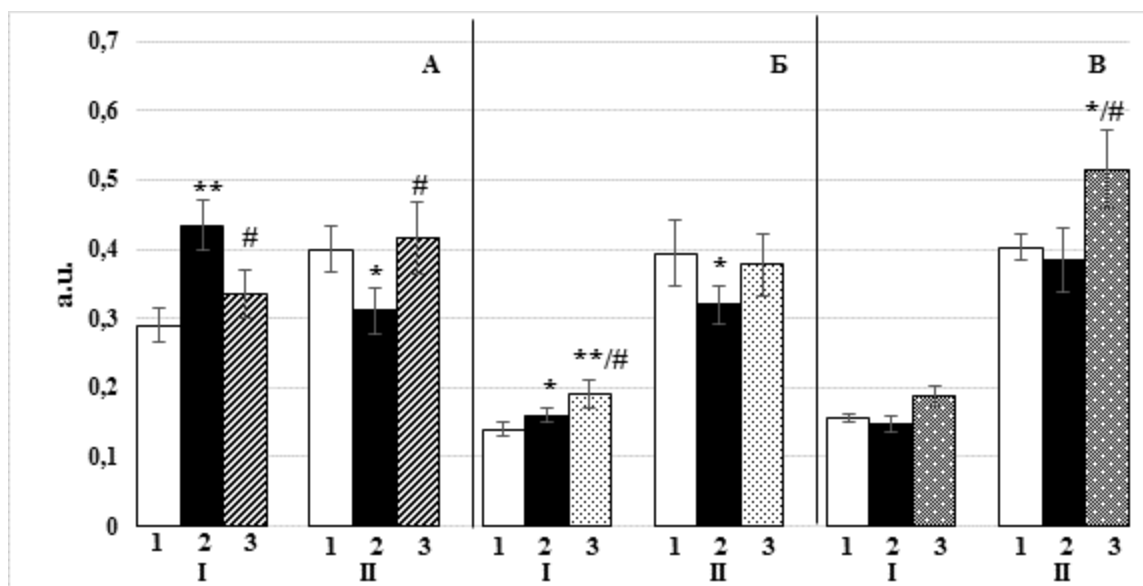


Рис 4. Рівень антизапальних цитокінів TGF- β (А), IL-4 (Б) , IL-10 (В) у сироватці крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг (І) та НДЦ в дозі 1 мг/кг (ІІ) ($M \pm m$): 1-контроль ($n=10$), 2-стрес+вода ($n=10$), 3-стрес і досліджувана речовина ($n=10$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ та *** $p < 0,001$ у порівнянні з контролем, # $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, що підлягали дії стресу.

Вивчення властивостей поліфенольних сполук підтверджується отриманими результати інших дослідників. Так регуляції експресії трансформуючого фактору росту (TGF)- β є одними з основних молекулярних механізмів дії поліфенольного комплексу куркуми (*Curcuma longa*) в тканинах шлунку [Sharma A.V., 2012].

Профілактичне введення НДЦ значно підвищило рівень IL-4 (19,4%, $p < 0,05$) в порівнянні з групою стрес+вода. Рівень IL-10 в групі НДЦ збільшувався на 34% ($p < 0,05$) порівняно з групою стрес+вода. За умов введення НДЦ та моделювання

стресу рівень TGF- β зростав на 32,25% ($p < 0,05$) у порівнянні з групою стрес+вода (рис. 4). Отримані дані можна пояснити результатами інших робіт де автори показали, що НДЦ здатний інгібувати реакції запалення гіпоталамусу за допомогою регулювання взаємозв'язку між NF- κ B сигналізацією і Nrf2 шляхом, індукуючою ланкою прозапальних процесів [Xu M., 2016]. Таким чином, отримані дані свідчать про значне зменшення запальних процесів та активації протизапального захисту при профілактичному введенні меланіну та НДЦ та моделюванні стрес-індукованих виразок шлунку.

Вплив меланіну на рівень гормонів кортизолу та адренкортикотропного гормону щурів за умов нервово-м'язового напруження. Аналізуючи вищенаведені результати досліджень, виявлено що меланін, при одноразовому введенні справляв більш виражений захисний вплив на СОШ до дії стресу у порівнянні з НДЦ. Тому подальші дослідження ми зосередили на поліфенольній сполуці меланін.

Контроль рівня глюкокортикоїдів є важливим маркером стрес-ураження організму. Встановлено, що в сироватці крові щурів після дії стресу, концентрація кортизолу зросла на 320% ($p < 0,001$), а АКТГ зменшилася відносно групи контролю на 56% ($p < 0,01$), що зумовлено відомим негативним зворотним зв'язком між концентрацією кортизолу в крові і рівнем секреції АКТГ гіпофізом (рис. 5).

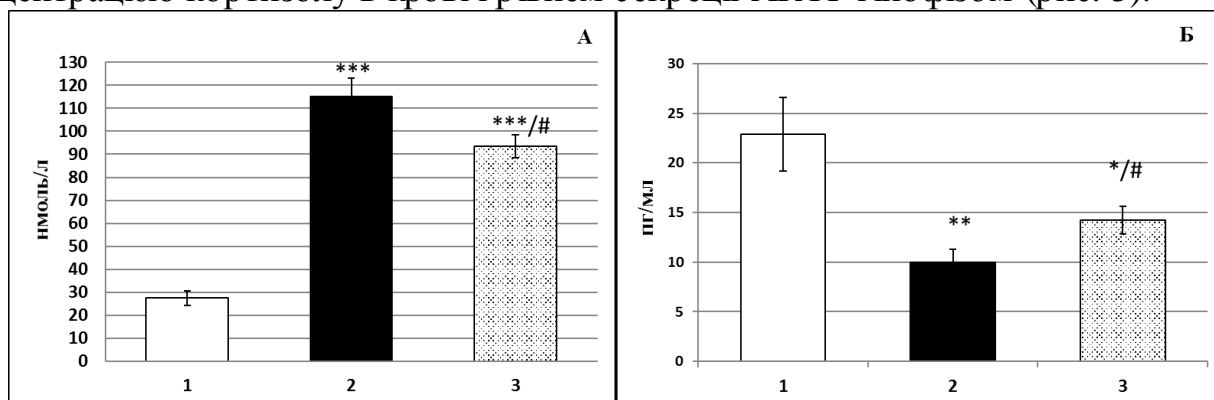


Рис. 5. Концентрація кортизолу (А) та АКТГ (Б) в плазмі крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг в.ш. ($M \pm m$): 1-контроль ($n=7$), 2-стрес ($n=7$), 3-стрес і меланін ($n=7$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ та *** $p < 0,001$ у порівнянні з контролем, # $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, що підлягала дії стресу

Введення тваринам меланіну перед дс' стресу викликало підвищення концентрації АКТГ на 42% ($p < 0,05$) та одночасне зниження кортизолу на 19% ($p < 0,05$) відносно значень групи стрес+вода (рис. 5). Одержані результати узгоджуються з даними Чижанської та співавт. [Чижанська Н.В., 2001], де дослідники показали, що профілактичне введення щурам меланіну з чорних дріжджів штаму *Nadsiniella nigra var. hesuelica* знижувало концентрацію кортизолу, відносно значень тварин, яким вводили воду.

Визначення електричних характеристик біомолекулярних ліпідних мембран. Питання про безпосередній вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран як базисного елемента у ланцюзі трансдукції хімічного

сигналу залишається досі не розкритим, що ускладнює інтерпретацію молекулярних механізмів реалізації його біологічної активності. Встановлено, що послідовне збільшення концентрації меланіну в розчині електроліту з цис-боку ліпідної мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9} - 10^{-6} М супроводжувалося експоненційним ростом питомої провідності ліпідної мембрани (максимально на $21,2 \pm 6,8\%$ при концентрації 10^{-6} М ($p < 0,05$)). При концентрації меланіну 10^{-5} М ($p < 0,05$) процес збільшення провідності припинявся і навіть відзначалося незначне зменшення її величини. Електрична ємність мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9} - 10^{-6} М зменшувалася (максимально на $8,4 \pm 1,7\%$ при концентрації 10^{-6} М ($p < 0,01$)). При подальшому збільшенні концентрації меланіну (10^{-5} М ($p < 0,05$)) величина електричної ємності стабілізувалася і навіть мала тенденцію до зростання. Отримані результати дозволяють припустити, що молекули меланіну при контакті з ліпідною мембраною проникають через центральну гідрофобну зону залишків жирних кислот фосфоліпідів, що призводить до збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшенню товщини його ізоляційної зони, про що свідчить зменшення ємності мембрани. Процес прямо залежить від концентрації мембранотропного агента (меланіну). Однак, при концентраціях меланіну 10^{-5} М ($p < 0,05$) його дезорганізуючий вплив на ліпідний бішар поступово нівелюється, що можна пов'язати з можливістю самопригнічення (накопиченням на поверхні або в об'ємі мембрани достатньої кількості меланіну для формування додаткового структурного або електростатичного бар'єру).

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена вивченню впливу меланіну та нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунку та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресу. Меланін та нанокристалічний діоксид церію (НДЦ) зміцнюють слизовий бар'єр шлунку, виявляють антиоксидантні, антизапальні та імуномодулюючі властивості, відновлюють функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи при іммобілізаційному стресі за Сельє, що свідчить про важливість даних сполук у підтриманні гомеостазу організму та слизової оболонки шлунку (СОШ). На основі результатів зроблені наступні висновки:

1. Профілактичне введення меланіну та НДЦ суттєво зменшувало площу виразкових уражень слизової оболонки шлунку (на 64% ($p < 0,05$) та $41,7\%$ ($p < 0,05$) відповідно), викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє.

2. Профілактичне введення меланіну та НДЦ попереджало деградацію протективних колагенових і неколагенових білків слизово-епітеліального бар'єру шлунку за дії стресу. При цьому меланін проявляв більш виражений захисний вплив у порівнянні з НДЦ, свідченням чого є зменшення концентрації вільного оксипроліну (на 29% ($p < 0,001$) проти 16% ($p < 0,001$) відповідно), фукози (на 16% ($p < 0,001$) проти 14% ($p < 0,05$) відповідно) та гексуронових кислот (на 24% ($p < 0,001$) проти $28,7\%$ ($p < 0,001$) відповідно).

3. Після трьох годин дії нервово-м'язового напруження за Сельє коефіцієнт маси наднирників зростав, тоді як тимусу зменшувався. За умов профілактичного

введення меланіну та НДЦ показники коефіцієнту маси наднирників та тимусу відновлювалися до контрольних значень.

4. Профілактичне введення меланіну та НДЦ призводило до відновлення порушеної про- та антиоксидантної рівноваги в СОШ та плазмі крові щурів за умов дії стресу, що підтверджується активацією ферментів антиоксидантного захисту та зменшенням вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів.

5. Досліджувані сполуки проявляли імуномодулюючі властивості за дією на:

- порушену стресом лейкоцитарну формулу крові. Так, при профілактичному введенні меланіну та НДЦ спостерігалось зменшення відсотку паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів відповідно до групи стрес+вода. Вміст лімфоцитів у групі щурів, яким перед нанесенням стресу вводили меланін та НДЦ, відновлювався на 27 % ($p < 0,05$) та 58,24% ($p < 0,05$) відносно групи стресу+вода;

- стабілізацію рівня про- та антизапальних цитокінів. Введення меланіну та НДЦ зменшувало рівень прозапальних цитокінів інтерлейкіну (ІЛ) – 1 β , ІЛ-12 β p40 та інтерферону- γ та підвищувало рівень антизапальних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 та TGF- β в сироватці крові щурів після дії стресу.

6. Введення меланіну впливало на стабілізацію рівня АКТГ на 42% ($p < 0,05$) та кортизолу на 19% ($p < 0,05$) відносно значень групи стресу+вода. Отриманий результат вказує на стресадаптогенні властивості меланіну.

7. Меланін проявляє мембранотропну активність, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару. Найбільш виражений вплив меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран здійснюється при концентрації 10^{-6} М ($p < 0,05$).

8. Меланін є перспективним засобом фармакологічної корекції стресу та може бути рекомендований до подальшого доклінічного вивчення.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Берегова Т.В. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунку щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє / Т.В. Берегова, Т.М. Фалалєєва, В.М.Кухарський, Н.В. Чижанська, **Д.В. Голишкін** //Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – №1. – С. 47-51. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та аналіз отриманих результатів)*

2. **Голишкін Д.** Вплив меланіну на електричні характеристики модельних біліпідних мембран (IN VITRO) / **Д. Голишкін**, В. Рибальченко, А. Бичко, Т. Берегова, Т. Фалалєєва // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.Серія «Біологія». – 2014. – №1 (66). – С. 90-92. *(Здобувачем проведено статистичний аналіз , написання статті)*

3. **Голишкін Д.** Вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії стресу та введення меланіну / **Д. Голишкін**, О. Вірченко, Т. Фалалєєва, Т. Галєнова, О. Савчук //Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія». – 2014. – №2 (67). – С. 69-73. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та статистичний аналіз, написання статті)*

4. **Голишкін Д.В.** Особливості лейкоцитарної формули крові щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразкових уражень шлунку та профілактичного

введення меланіну / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, Н.В. Чижанська, Л.І. Остапченко // Український антарктичний журнал. – 2015. – №14. – С. 100-104. *(Здобувачем проведено експериментальну частину дослідження та статистичний аналіз, написання статті)*

5. **Голишкін Д.В.** Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунку та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, К.С. Непорада, Т.В. Берегова // Фізіологічний журнал. – 2015. – №2 (61). – С. 66-73. **(Scopus)**. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та статистичний аналіз, написання статті)*

Статті у іноземних виданнях

6. Savytskyu Ya. Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension according to Selye / Ya. Savytskyu, T. Falalyeyeva, **D.Golyshkin** // Annales universitatis Mariae Curie – Sklodowska.- 2010. – №2.- P. 251-255 **(Scopus)**. *(Здобувачем проведено експериментальну частину дослідження та аналіз отриманих результатів)*

7. **Golyshkin D.** Nanocrystalline cerium dioxide efficacy for prophylaxis of erosive and ulcerative lesions in the gastric mucosa of rats induced by stress / **D. Golyshkin**, N. Kobylak, O. Virchenko, T. Falalyeyeva, T. Beregova, L. Ostapchenko, M. Caprnda, L. Skladany, R. Opatrilova, L. Rodrigo, P. Kruzliak, A. Shcherbokov, M. Spivak // Biomedicine & Pharmacotherapy – 2016. – №84. – P. 1383-1392. **(Scopus)**. *(Здобувачем проведено експериментальну частину дослідження, статистичний аналіз та написання статті)*

Тези наукових доповідей

8. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунку щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, В.М. Кухарський // V Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології", 13-15 травня, 2009. Львів, Україна. – С. 244-245.

9. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунку та стан про- та антиоксидантної системи у щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова // XIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, 13-15 квітня, 2010. Тернопіль, Україна. – С. 222.

10. Вплив меланіну на слизову оболонку шлунку та масу наднирникових залоз і тимусу у щурів за умов дії стресу / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова // VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології", 5-8 квітня, 2011. Львів, Україна. – С. 369-370.

11. Дослідження механізмів стреспротекторної дії меланіну / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, В.М. Кухарський // V Міжнародна Антарктична конференція "Антарктика і глобальні системи землі: нові виклики та перспективи", 17-19 травня, 2011. Київ, Україна. – С. 196-197.

12. Влияние меланина на состояние гуморальной и стреспротекторной систем крыс в условиях стресса / **Д.В. Гольшкин**, Т.М. Фалалеева, Т.В. Береговая, В.М. Кухарский // III Международная научно-практическая конференция «Достижения молодых ученых в развитии инновационных процессов в экономике, науке, образовании», 10-12 октября, 2011. Брянск, Россия. – С. 237-238.

13. About the mechanisms of melanin stress-protective action / **D. Golyskin**, T. Beregova, T. Falalyeyeva, Ya. Savytskyu // 4th International Scientific Conference "Advances in pharmacology & pathology of the digestive tract", September 26-28, 2012. Kiev, Ukraine. – P. 40.

14. Вплив меланіну на структуру бімолекулярних ліпідних мембран / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, А.В. Бичко // VII Міжнародна конференція молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери", 13-15 травня, 2012. Харків, Україна. – С. 108-109.

15. Вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, А.В. Бичко, Т.В. Берегова // IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології", 16-19 квітня, 2013. Львів, Україна. – С. 17-18.

16. Дослідження впливу меланіну на структуру біліпідного матриксу клітинних мембран / **Д.В. Голишкін**, А.В. Бичко, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова // VI міжнародна Антарктична конференція "Інтерналізація досліджень в Антарктиці – шлях до духовної єдності людства", 15-17 травня, 2013. Київ, Україна. – С. 109-112.

17. Melanin influence on the gastric mucosa oxidative condition and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis under acute stress according to Selye / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, К.О. Дворщенко, Т.В. Берегова // II Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження 2014», 15-17 грудня, 2014. Київ, Україна. – С. 13.

18. Вплив меланіну на стан слизового бар'єру шлунку за умов дії гострого стресу / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, К.С. Непорада, Т.В. Берегова // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", 20-23 квітня, 2015. Львів, Україна. – С. 443-444.

19. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунку та реакцію цитокін-сигнальної системи за умов дії гострого стресу / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, Т.І. Галенова, К.С. Непорада, Т.В. Берегова // VII Міжнародна Антарктична конференція "Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети", 12-14 травня, 2015. Київ, Україна. – С. 51-53.

20. Вплив нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунку за умов дії гострого стресу / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, М.Я. Співак, К.С. Непорада, Т.В. Берегова // Науково-практична конференція «Пробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань», 4-6 вересня, 2015. Київ, Україна. – С. 18.

21. Prophylactic influence of nanocrystalline cerium dioxide on the gastric mucosa injuries / **D. Golyskin**, O. Virchenko, T. Falalyeyeva, T. Beregova, M. Spivak // Advanced Lecture Course «Molecular basis of human disease», May 27th – June 1st, 2016. Spetses island, Greece. – P. 33.

22. Вплив меланіну та нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунку та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресу / **Д.В. Голишкін**, Т.М. Фалалєєва, К.С. Непорада, К.О. Дворщенко, Т.В. Берегова // VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні функції в нормі і патології», 17-20 жовтня, 2017. Київ, Україна. – С. 34.

АНОТАЦІЯ

Голишкін Д.В. Вплив меланіну та нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунку та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресу. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена вивченню та порівнянню впливу меланіну та нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на стан слизової оболонки шлунку (СОШ) та реакцію кори наднирників за умов профілактичного введення щурам досліджуваних сполук та дії іммобілізаційного стресу за Сельє.

Встановлено, що при внутрішньошлунковому введенні меланіну та НДЦ ураженість СОШ у порівнянні з групою стрес-контролю, була значно меншою. За умов профілактичного введення меланіну та НДЦ показники коефіцієнту маси наднирників та тимусу були на рівні контрольних значень. Введення меланіну та НДЦ попереджало деградацію протективних колагенових і неколагенових білків слизово-епітеліального бар'єру шлунку обумовлену дією стресу. Введення досліджуваних сполук приводило до відновлення порушеної про- та антиоксидантної рівноваги в СОШ та плазмі крові щурів за умов дії стресу. Меланін та НДЦ проявляли імуномодулюючі властивості за дією на порушену стресом лейкоцитарну формулу крові та стабілізацію рівня про- та антизапальних цитокінів. Отже, меланін, при одноразовому введенні справляв більш виражений захисний вплив на СОШ до дії стресу у порівнянні з НДЦ. Тому подальші дослідження ми зосередили на поліфенольній сполуці меланін. Показано, що введення меланіну впливало на стабілізацію рівня АКТГ та кортизолу в організмі щурів. Меланін проявляє мембранотропну активність, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару. Меланін є перспективним засобом фармакологічної корекції стресу та може бути рекомендований до подальшого доклінічного вивчення.

Ключові слова: стрес, виразкова хвороба шлунку, наднирники, меланін, нанокристалічний діоксид церію.

АННОТАЦИЯ

Гольшкін Д.В. Влияние меланина и нанокристаллического диоксида церия на состояние слизистой оболочки желудка и реакцию коры надпочечников в условиях действия острого стресса. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертационная работа посвящена изучению и сравнению влияния меланина и нанокристаллического диоксида церия (НДЦ) на состояние слизистой оболочки желудка (СОЖ) и реакцию коры надпочечников в условиях профилактического введения крысам исследуемых соединений и действия иммобилизационного стресса по Селье.

Установлено, что при пероральном введении меланина и НДЦ поражение СОЖ, по сравнению с группой стресс-контроля, было значительно меньшим. В условиях профилактического введения меланина и НДЦ показатели коэффициента массы надпочечников и тимуса были на уровне контрольных значений. Введение меланина и НДЦ предупреждало деградацию протективных коллагеновых и неколлагеновых белков слизисто-эпителиального барьера желудка обусловленную действием стресса. Введение исследуемых соединений приводило к восстановлению нарушенного про- и антиоксидантного равновесия в СОЖ и плазме крови крыс в условиях действия стресса. Меланин и НДЦ проявляли иммуномодулирующие свойства на нарушенную стрессом лейкоцитарную формулу крови и стабилизировали уровень про- и противовоспалительных цитокинов. В итоге, меланин при однократном введении производил более выраженное защитное влияние на СОЖ в условиях действия стресса по сравнению с НДЦ. В связи с этим дальнейшие исследования мы сосредоточили на полифенольном соединении меланина. Показано, что введение меланина влияло на стабилизацию уровня АКТГ и кортизола в организме крыс. Меланин проявляет мембранотропную активность, что реализуется путем повышения проводимости и уменьшения электрической емкости липидного бислоя. Меланин является перспективным средством фармакологической коррекции стресса и может быть рекомендован к дальнейшему доклиническому изучению.

Ключевые слова: стресс, язвенная болезнь желудка, надпочечники, меланин, нанокристаллический диоксид церия.

ABSTRACT

Golyshkin D.V. The influence of melanin and nanocrystalline cerium dioxide on the state of gastric mucosa and the adrenal cortex reaction in the conditions of acute stress. – Manuscript.

Thesis for PhD degree in specialty 03.00.13 – Human and animal physiology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis is dedicated to the investigation and comparison of the influence of melanin and nanocrystalline cerium dioxide (NCD) on the state of the gastric mucosa (GM) and adrenal cortex reaction in conditions of prophylactic introduction of the studied compounds into rats and the effect of immobilization stress by Selye.

It was shown that severity of GM damage was significantly lower when melanin was administered 30 minutes before the stress at a dose of 5 mg/kg (в.ш.) and NCD at a dose of 1 mg/kg (в.ш.) compared to the stress-control group. The decrease of erosions under the influence of both substances was found at trends. After three hours of neuromuscular stress by Selye, the mass of the adrenal glands increased, while the thymus decreased. Under conditions of prophylactic administration of melanin and NCD, the adrenal and thymus mass ratios were at level of the control.

It has been demonstrated that prophylactic administration of melanin and NCD prevents stress-following degradation of protective collagen and non-collagen proteins of the mucosal-epithelial gastric barrier, indicating by a decrease in the concentration of free oxyproline, fucose and hexuronic acids. In this case, the integrity of the mucous barrier

was close to the values of control rats that confirmed by the results of macroscopic analysis of the GM. Prophylactic administration of melanin and NCD resulted in the restoration of an excited pro-and antioxidant balance in the rats GM under acute stress conditions, which is confirmed by the activation of the enzymes of the antioxidant defense and the decrease in the content of lipid peroxidation products. Melanin and NCD exhibited immunomodulatory properties by action on stress-induced shift in blood leukocyte formula and stabilization of pro- and anti-inflammatory cytokines level.

As a result, melanin single injection, produced more pronounced protective effect on the GM compared with NCD under acute stress conditions. Therefore, further research was focused on the study of the melanin polyphenolic compound. It was shown that the administration of melanin affected the stabilization of the levels of ACTH and cortisol in the rat serum. The mechanism of melinin penetration through the central hydrophobic zone of cell membranes was proposed for the first time. It was shown on the basis of established membranotropic activity. It is realized by increasing the conductivity and decreasing the electric capacity of the lipid bilayer model. This explains the implementation of the antioxidant properties of melanin at the cellular level.

The obtained results resolve deepens understanding of the stress-protective effect of melanin and NCD on the stomach mucous membrane. These compounds are promising instruments of pharmacological stresses correction and could be recommended for further preclinical investigation. Such drugs are necessary for the prevention and treatment of the consequences of hostilities, catastrophes and surgical interventions. They can be used in any situations that cause psycho-emotional stress and the tension of adaptation mechanisms.

Key words: stress, stomach ulcer, adrenal cortex, melanin, nanocrystalline cerium dioxide.