

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПРИСЯЖНЮК АЛЬОНА ІГОРІВНА

УДК 616.34-002-02-092+616.833

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Присяжнюк А.І.

Науковий керівник: д.б.н., ст.н.с. Толстанова Ганна Миколаївна

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

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

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

Dissertation is dedicated to the investigation of peripheral dopaminergic system and role of D2- and D3-dopamine receptors (DR) in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Ulcerative colitis (UC) is the chronic inflammatory disease of the unknown etiology. Little is known on the role of peripheral dopaminergic system in the pathogenesis of UC, despite the evidence that dopaminergic hypoactivity may result in excessive inflammation. The development of inflammation under the conditions of experimental UC is associated with a violation of dopaminergic signaling in the colon. The peripheral dopaminergic system causes a predominantly negative effect on the experimental UC flow, which is mediated by changes in phagocytic activity and profile of granulocytes and peripheral blood monocytes; and increased endothelial permeability. It was shown that during experimental UC levels of proteins TH, MAO-B and DAT were decreased in the rat colon mucosa, which may indicate about the impaired dopamine metabolism in colonic mucosa during inflammation. In addition, changes in the level of protein D2-DR were shown, which were dependent on the stage of experimental UC. It is established that in the normal condition, D3-DR are

localized on the endo- and epithelial cells and the enteric neurons of the colon. During the experimental UC, the localization of D3-DR was predominantly epithelial, and their level was significantly reduced. The state of the dopaminergic system of patients with non-specific UC in comparison to non-inflamed colon was analyzed. It was shown that level of protein TH was decreased by 25%, D2- and D3-DR by 70% in inflamed colon. There were no apparent changes in the protein level of DAT. Activation of D2-DR by selective agonists quinpirole and cabergoline had an anti-ulcer and anti-inflammatory effect during experimental colitis in rats. This effect was not related to changes in the epithelial permeability of rat's colon mucosal layer. However, D2-DR activation led to the inhibition of the extraction of albumin from the blood vessels of the rat's colon mucosal layer, indicating a decrease in endothelial permeability and, accordingly, inflammation during experimental UC. The positive effect of D2-DR on endothelial permeability is associated with the predominance of activation of the central D2-DR. Src- and Akt-protein kinases are involved in the mechanism of D2-DR-mediated influence on the endothelial permeability of colon mucosal layer in rats with experiential UC. Activation of the D3-DR by the low-dose of selective agonist 7-OH-DPAT (0.02 mg / 100 g) significantly reduced the clinical, macro, and microscopic manifestations of experimental UC in rats. It was found that the development of experimental UC had a dysregulation between the total concretion of glycoproteins and the composition of their carbohydrate part, especially during the acute stage of the disease (0.5-6 h). This was manifested in the gradual increase in the concentration of glycoproteins, hexosamines, sialic acids, but the concentration of hexoses and fucose was lower than control at 6 hours of experimental UC. The activation of D3-DR resulted in the simultaneous increase of the concentration of general glycoproteins and hexoses in the surface mucus, as well as to the increase in functional reserve of peritoneal macrophages and mast cells under experimental

UC. During the destruction of peripheral dopaminergic neurons we observed an improvement in the morphological characteristics of experimental UC. One of the possible regulatory mechanism on the experimental UC flow may be the regulatory effect of dopaminergic signaling on the phenotype of monocytes and their respiratory activity.

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

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. **Prysiazhniuk A.**, Dovbynchuk T., Kopyyak B., Tolstanova G. The role of central and peripheral D2R receptors in the mechanism of colonic vascular permeability during experimental colitis in rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, series "Problems of physiological functions regulation"*. 2017; 1(22): 39-43.
2. **A.I. Prysiazhniuk**, M.P. Rudyk, T.M. Chervinska, T.V. Dovbynchuk, I.V. Opeida, L.M. Skivka. Role of peripheral dopaminergic system in the pathogenesis of experimental colitis in rats. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017; 89(4): 56-67.
3. **Присяжнюк А.І.**, Шолох А.О., Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М. Загальна кількість та вуглеводний склад слизу товстої кишки щурів за умов експериментального коліту. *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія*. 2017; 2(78): 56-61.
4. Tolstanova G., Deng X., Ahluwalia A., Paunovic B., **Prysiazhniuk A.**, Ostapchenko L., Tarnawski A., Sandor Z., Szabo S. Role of Dopamine and Dopamine D2 receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60(10): 2963-2975.
5. **Присяжнюк А.**, Нестерук К., Червінська Т., Толстанова Г. Експресія та локалізація D3-дофамінових рецепторів за умов експериментального виразкового коліту. *Вісник Київського Національного Університету ім. Тараса Шевченка*. 2015; 2(19): 10-13.
6. **Присяжнюк А.І.**, Шолох А.О., Довбинчук Т.В., Червінська Т.М., Толстанова Г.М. Роль периферичної дофамінергічної системи в патогенезі виразкового коліту у щурів. XI Всеукраїнська науково-практична

конференція молодих вчених “Актуальні питання клінічної медицини” (27 жовтня 2017, Запоріжжя). Запоріжжя; 2017. с. 54-55.

7. Prysiazhniuk A. Dovbynychuk T., Holota Y., Vareniuk I., Garmanchuk L., Tolstanova G. The mechanism of protective role of D3 dopamine receptors in pathogenesis of ulcerative colitis. In: UEG J. 2017; 5(5) suppl. p. 268.

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

9. M.P. Rudyk, I.V. Opeida, V.M. Svyatetska, A.I. Prysiazhniuk. Microglia and circulating phagocyte metabolic profile in rats with MPTP-induced Parkinson’s disease and concomitant ulcerative colitis. In: 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17-19 May 2017, Genoa. Genoa, Italy; 2017. p. 151-152.

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

11. Присяжнюк А. Дзюбенко Н., Толстанова Г. Стан дофамінергічної системи товстої кишки пацієнтів з рецидивуючим виразковим колітом. Збірник тез: «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Міжнародна наукова конференція-конкурс молодих вчених», 26-27 травня 2016, Київ. Київ; 2016. с. 86.

12. Prysiazhniuk A. Dziubenko N., Kernychnyi V., Szabo S., Tolstanova G. The role of D3-dopamine receptors in the ulcerative colitis pathogenesis. In: Book of abstracts of ‘9th International Symposium on Cell/Tissue Injury and

Cytoprotection/Organoprotection', 15-17 September 2016, Cracow. Cracow, Poland; 2016. p. 45.

13. Присяжнюк А. Дзюбенко Н., Керничний В., Червінська Т., Толстанова Г. Роль ДЗ-дофамінових рецепторів в патогенезі виразкового коліту. Збірник тез: “Об’єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень”, 10-11 листопада, Київ. Київ, 2016; с. 44-45.

14. Kernychnyi V., Dziubenko N., **Prysiazhniuk A.** Tolstanova G. Impaired Peripheral Dopaminergic System in Patients with Ulcerative Colitis. In: The FASEB Journal. 2015; 29(1): Suppl. LB544.

15. Присяжнюк А. Дзюбенко Н., Керничний В., Толстанова Г. Стан дофамінергічної системи товстої кишки пацієнтів з рецидивуючим виразковим колітом. Збірник тез конференції молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015”, 23-24 квітня 2015, Київ. Київ; 2015. с. 55.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	23
1.1. Загальна характеристика та функції дофамінергічної системи	23
1.1.1 Особливості метаболізму дофаміну.....	24
1.1.2 Дофамінові рецептори.....	27
1.1.2.1 Джерело дофаміну та локалізація дофамінових рецепторів в шлунково-кишковому тракті.....	29
1.1.3 Роль дофаміну в регуляції ендотеліальної проникності.....	31
1.1.4 Дофамін-регулятор імунної відповіді.....	32
1.2. Патогенез запальних захворювань кишечника.....	33
1.2.1 Кишковий бар'єр та його роль в патогенезі запальних захворювань кишечника.....	34
1.2.1.2 Роль ендотелію та ендотеліальної проникності в патогенезі запальних захворювань кишечника.....	38
1.2.2 Особливості імунологічної відповіді за розвитку запальних захворювань кишечника.....	40
1.3. Роль дофаміну в процесах виразквоутворення в шлунково-кишковому тракті.....	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	48
2.1. Матеріали та реактиви.....	48
2.2. Експериментальні тварини.....	49
2.3. Моделювання експериментального коліту ректальним	

	введенням SH-алкілатора - йодоацетаміду щурам.....	50
2.4.	Моделювання руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МРТР).....	51
2.5	Умови забору та використання біопсійного матеріалу пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом.....	52
2.6	Визначення ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів <i>in vivo</i>	53
2.7.	Визначення епітеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів <i>in vivo</i>	54
2.8.	Визначення загальної концентрації білка за методом Бредфорд.....	54
2.9.	Вестерн блот аналіз.....	55
2.10.	Ізоляція поверхневого слизу товстої кишки щурів.....	57
2.10.1.	Визначення секреції слизу за ШИФ-реакцією на PVDF-мембрані.....	57
2.10.2.	Визначення концентрації загальних глікопротеїнів слизу за реакцією з реактивом Фоліна (за білковим компонентом).....	58
2.10.3.	Визначення концентрації гексоз у складі слизу.....	59
2.10.4.	Визначення концентрації фукози у складі слизу.....	60
2.10.5.	Визначення концентрації гексозамінів у складі слизу.....	61
2.10.6.	Визначення концентрації сіалових кислот у складі слизу.....	61
2.11.	Гістологічний та морфометричний аналіз.....	62
2.12.	Імуногістохімічний аналіз.....	63
2.13.	Цитохімічне визначення стану келихоподібних клітин.....	64
2.13.1	Цитохімічне визначення стану тучних клітин.....	64

2.14.	Активність мієлопероксидази.....	64
2.15.	Первинна культура перитонеальних макрофагів.....	65
2.15.1.	Культивування перитонеальних макрофагів.....	66
2.16.	НСТ-тест.....	66
2.17.	Внутрішньоклітинне вимірювання активних форм кисню.....	67
2.18.	Визначення фагоцитарної активності лейкоцитів.....	67
2.19.	Визначення профілю лейкоцитів методом проточної цитометрії.....	68
2.20.	Схеми фармакологічних експериментів.....	68
2.20.1.	Дослідження особливостей перебігу йодоацетамід-індукованого коліту у тварин з хімічно-зруйнованими периферичними дофамінергічними нейронами.....	69
2.20.2.	Дослідження ролі периферичних D ₂ -дофамінових рецепторів на зміни ендотеліальної проникності товстої кишки щурів на фоні розвитку експериментального йодоацетамід-викликаного коліту.....	70
2.20.3.	Дослідження ефекту активації D ₂ -дофамінових рецепторів каберголіном на показники розвитку експериментального йодоацетамід-викликаного коліту у щурів.....	71
2.20.4.	Дослідження ефекту активації D ₂ -дофамінових рецепторів квінпіролом на показники розвитку експериментального йодоацетамід-індукованого коліту у щурів.....	71
2.20.5.	Дослідження ефекту активації D ₃ -ДР 7-ОН-DPAT на показники розвитку експериментального йодоацетамід-індукованого коліту у щурів.....	72
2.26.	Статистичний аналіз отриманих результатів.....	72

РОЗДІЛ 3. СТАН ПЕРИФЕРИЧНОЇ ДОФАМІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ В ПАТОГЕНЕЗІ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ.....	74
3.1. Рівень тирозинової гідроксилази в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого коліту.....	74
3.2. Рівень та локалізація дофамінового транспортеру в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід- індукованого коліту.....	75
3.3. Рівень моноамінооксидази-Б в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого коліту.....	78
3.4 Рівень Д2-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого коліту.....	79
3.5 Рівень та локалізація Д3-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід- індукованого коліту.....	81
3.6 Стан периферичної дофамінергічної системи у пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом.....	84
3.6.1 Імуногістохімічна ідентифікація тирозинової гідроксилази в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом.....	84
3.6.2 Імуногістохімічна ідентифікація дофамінового транспортеру в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом.....	85
3.6.3 Імуногістохімічна ідентифікація Д2-дофамінових рецепторів в	

	слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом.....	86
3.6.4	Імуногістохімічна ідентифікація D3-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом.....	87
РОЗДІЛ 4.	БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ, ОПОСЕРЕДКОВАНІ АКТИВАЦІЄЮ D2-ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ.....	90
4.1.	Макро- та мікроскопічні показники перебігу експериментального коліту у щурів за введення агоністу D2-дофамінових рецепторів квінпіролу та каберголіну.....	90
4.2.	Роль D2-дофамінових рецепторів в регуляції епітеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов експериментального коліту.....	94
4.3.	Роль D2- дофамінових рецепторів в регуляції ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов експериментального коліту.....	95
4.4.	Залучення Src- та Akt- кіназних шляхів до механізмів перебігу експериментального коліту у щурів за умов активації D2-дофамінових рецепторів.....	97
4.5.	Визначення ролі центральних та периферичних D2-дофамінових рецепторів в регуляції ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов експериментального коліту.....	98
РОЗДІЛ 5.	БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ, ОПОСЕРЕДКОВАНІ	

АКТИВАЦІЮ ДЗ-ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ.....	102
5.1. Макро- та мікроскопічні показники перебігу експериментального коліту у щурів за введення агоністу ДЗ-дофамінових рецепторів 7-ОН-ДРАТ.....	102
5.2. Вплив ДЗ-дофамінових рецепторів на рівень та біохімічний склад слизу за експериментального коліту у щурів.....	105
5.2.1. Біохімічний склад слизу товстої кишки щурів за експериментального коліту.....	105
5.2.2. Біохімічний склад слизу товстої кишки щурів за введення агоністу ДЗ-дофамінових рецепторів 7-ОН-ДРАТ на тлі експериментального коліту.....	112
5.3. Цитохімічне визначення стану келихоподібних клітин за введення агоністу ДЗ-дофамінових рецепторів – 7-ОН-ДРАТ за умов експериментального коліту.....	115
5.4. Вплив ДЗ-дофамінових рецепторів на активність перитоніальних макрофагів за умов експериментального коліту у щурів.....	116
5.5. Цитохімічне визначення стану тучних клітин за введення агоністу ДЗ-дофамінових рецепторів – 7-ОН-ДРАТ за умов експериментального коліту.....	118
РОЗДІЛ 6. БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ КОЛІТІ ЗА УМОВ РУЙНУВАННЯ ПЕРИФЕРИЧНИХ ДОФАМІНЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ.....	121
6.1. Встановлення ролі периферичної дофамінергічної системи в патогенезі експериментального коліту.....	121

6.1.1.	Рівень тирозинової гідроксилази у мозку та товстій кишці щурів за руйнування периферичної дофамінергічної системи шляхом введення 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МРТР).....	121
6.1.2	Клінічні та макроскопічні показники перебігу експериментального коліту у щурів за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР.....	123
6.2.	Біохімічні та імунологічні показники фагоцитів периферичної крові щурів при експериментальному коліті за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР.....	126
6.2.1	Біохімічні та імунологічні показники гранулоцитів периферичної крові щурів при експериментальному коліті за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР.....	126
6.2.2	Біохімічні та імунологічні показники моноцитів периферичної крові щурів при експериментальному коліті за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР.....	129
	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	134
	ВИСНОВКИ.....	155
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	157
	ДОДАТОК.....	182

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

ВК – виразковий коліт

Д2 - дофамінові рецептори другого типу

Д3 - дофамінові рецептори третього типу

ДАТ – дофаміновий транспортер

ДР – дофамінові рецептори

ЗЗК – запальні захворювання кишечника

ЙА – йодоацетамід

КОМТ – катехоламініотрансфераза

МАО - моноамінооксидаза

МПО – мієлопероксидаза

МРТР – 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропірин

МЦ – метилцелюлоза

СОТК – слизова оболонка товстої кишки щурів

ТН – тирозинова гідроксилаза

ХК – хвороба Крона

ЦНС – центральна нервова система

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВСТУП

Актуальність теми. Дофамін – це біогенний амін, загальновідомий як нейромодулятор центральної нервової системи, що бере участь у регуляції локомоторної, когнітивної функцій та системи винагороди [1]. Дофамін опосередковує свої ефекти через взаємодію з G-протеїн-зв'язаними дофаміновими рецепторами (ДР) - D1-D5 типу [2].

Відомо, що 40% дофаміну має периферичне походження, включаючи шлунково-кишковий тракт [3]. Чисельні дослідження на симпатомованих тваринах показали наявність тирозинової гідроксилази (фермент, що лімітує синтез дофаміну) в не-нейрональних клітинах (епітеліальних, м'язевих, ендотеліальних та лейкоцитах) [3; 4]. Більш того, доведено важливу роль кишкової мікробіоти в синтезі біологічно-активного дофаміну [5; 6]. В останні роки з'являється все більше повідомлень про регуляторну роль периферичного дофаміну, зокрема в забезпеченні імунної відповіді та нейро-імунної взаємодії; регуляції кров'яного тиску; рівня та метаболізму глюкози; підтримці ендотеліального бар'єру, пригніченні розвитку патологічного ангиогенезу [7; 8; 9; 10; 11].

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК), до яких належить неспецифічний виразковий коліт (ВК) та хвороба Крона (ХК), характеризуються хронічними виразками та запаленням стінки кишечника, мають прогресуючий і деструктивний перебіг і, отже, можуть спричиняти різні ускладнення, включаючи стенози, абсцеси, свищі, позакишкові прояви та підвищують ризик колоректального канцерогенезу. ЗЗК можуть виникати в будь-якому віці, більше ніж 50% хворих знаходиться в працездатному віці. Сучасні терапевтичні підходи (пр. інфліксімаб, ведолізумаб) [12] по-перше не

призводять до тривалої ремісії, більш того мають високу ціну і тому є недоступними для більшості українських пацієнтів. Зважаючи на те, що перебіг даної хвороби має рецидивуючий характер, що обумовлює витрати держави на лікарняні листки, а також те, що ЗЗК в ряді випадків стають причиною інвалідизації, пошук нових терапевтичних мішеней на основі більш глибокого розуміння патогенезу ЗЗК має не лише фундаментальне але і важливе соціально-економічне значення.

Перші спостереження про роль дофаміну в підвищенні ризику до виразкоутворення гастроудоденальної зони було зроблено в 1965 році, на пацієнтах з хворобою Паркінсона (гіпофункція центральних дофамінергічних нейронів) [13] і, підтверджена, відсутність даного феномену у пацієнтів з шизофренією (гіперфункція дофамінергічної системи) [14]. Ці дані були підтвержені застосуванням селективних агоністів та антагоністів ДР на експериментальних моделях гастроудоденальних виразок [15].

Д1-Д5- ДР були знайдені по всій довжині ШКТ, з переважанням Д2- та Д3-ДР в товстій кишці [16]. У пацієнтів, хворих на ЗЗК [17] та на моделі експериментального ВК у щурів [18] встановлено зниження рівня L-3,4-дигідрофенілаланіну та дофаміну в слизовій оболонці товстої кишки. На Tbet(-/-) та Rag2(-/-) мишачих моделях коліту було показано значне зниження дофаміну фекалій в гострий період хвороби [10]. Більше того, поліморфізм Taq1A Д2-ДР, що відповідає за зниження щільності рецепторів, асоційований з рефракторною ХК [19]. Наведене вище, свідчить про перспективність дослідження ролі периферичного дофамінергічного сигналіngu в патогенезі ЗЗК, як мішені для лікування даної патології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетних тем "Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку

різних патологій” (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.), "Дофамінергічна система в патогенезі запальних захворювань кишечника: клініко-експериментальні дослідження" (№ д/р – 0115U0002601, 2015 р.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.). Тема дисертації затверджена вченою радою ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №8 від 23 березня 2015 року).

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

Відповідно до мети перед було потавлено наступні завдання:

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

Об’єкт дослідження: біохімічні механізми патогенезу ЗЗК.

Предмет дослідження: периферичний дофамінергічний сигналінг.

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

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено, що у щурів з експериментальним колітом порушений дофамін-опосередкований сигналінг в СОТК щурів, що обумовлено зниженням рівня ферментів ТН, МАО-Б, ДАТ і різнонаправленими змінами рівня Д2- та Д3-ДР. У біопсійному матеріалі товстої кишки пацієнтів на неспецифічний ВК також показано зниження рівня протеїну ТН, Д2- та Д3-ДР. Встановлено, що активація Д2-ДР пригнічує ендотеліальну проникність СОТК щурів за умов експериментального ВК через залучення Src та Akt кінази. Цей ефект частково опосередковується через активацію центральних Д2-ДР і сприяє гоєнню експериментального ВК. Активація Д3-ДР справляє протективну дію за умов експериментального ВК, частково за рахунок збільшення концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу та підвищення функціонального резерву тучних клітин СОТК щурів та перитонеальних макрофагів. Показано, що порушення дофамінергічного сигналінгу на периферії асоціюється зі змінами у респіраторній активності та імунологічному профілі гранулоцитів та моноцитів крові в нормі та за умов експериментального ВК.

Практичне значення одержаних результатів. Доведено, що застосування препаратів з дофамінергічною активністю, а саме агоністів Д2- та Д3-ДР, є ефективним в прискоренні гоєння уражень при

експериментальному ВК і може бути рекомендованим для подальшого клінічного випробування.

Особистий внесок здобувача. Інформаційний пошук, проведення експерименту та аналіз результатів дослідження виконані дисертантом особисто. Формування ідеї роботи, планування та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів проведено за участю наукового керівника ст.н.с., д.б.н. Толстанової Г.М. Допомогу в проведенні молекулярно-біологічних досліджень надавала м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М., імуногістохімічних – м.н.с., к.б.н. Дзюбенко Н.В., цитохімічних – доц, к.б.н. Варенюк І.М., імунологічних - асистент, к.б.н. Рудик М., робіт із тваринами - м.н.с, к.б.н. Довбинчук Т.В., що відображається у спільних публікаціях. Парафінові блоки архівного біопсійного матеріалу для імуногістохімічних досліджень були надані лікарем-проктологом, к.м.н. Керничним В.В., в рамках сумісної роботи над проектом "Дофамінергічна система в патогенезі запальних захворювань кишечника: клініко-експериментальні дослідження" (2015 р., № 15БФ036-01, № держреєстрації – 0115U0002601), що відображено в заключному звіті та спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: Європейському гастроентерологічному тижні UEGW-2017 (Барселона, Іспанія); XI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Актуальні питання клінічної медицини” (Запоріжжя, Україна, 2017); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ” (Львів, Україна, 2017); 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Генуя, Італія, 2017); ‘Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century’ (Київ, Україна, 2016); «Актуальні

проблеми біохімії та біотехнології: Міжнародна наукова конференція-конкурс молодих вчених» (Київ, Україна, 2016); '9th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection' (Краків, Польща, 2016); "Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень" (Київ, Україна, 2016); міжнародній літній школі 'Perspectives for young scientists in life sciences: mastering global challenges of the modern society' (Івано-Франківськ, Україна, 2016); міжнародній конференції 'Experimental Biology' (Бостон, США, 2015); "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015" (Київ, Україна, 2015).

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

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика та функції дофамінергічної системи

Однією з найважливіших аміноергічних систем стовбура головного мозку є дофамінергічна система – сукупність взаємопов’язаних нейронів, які секретують дофамін як нейромедіатор. Тіла дофамінергічних нейронів розташовані на рівні середнього мозку та утворюють комплекс нейронів чорної субстанції та вентрального поля покрівлі. Крім того, в мозку спостерігається дифузний розподіл дофамінергічних елементів у вигляді окремих клітин з відростками. Найбільшу кількість медіатора виявлено в хвостатому ядрі, лушпині, а також у чорній субстанції середнього мозку [20].

Однак синтез і функціонування медіатора відбуваються не лише в межах центральної нервової системи. Як самостійний продукт дофамін синтезується клітинами звивистих каналців нирок [21], ентерохромафінними клітинами органів ШКТ, підшлунковою залозою, селезінкою [3] та деякими клітинами імунної системи (наприклад, лімфоцитами) [22].

Крім того, дофамін є проміжним продуктом синтезу адреналіну/норадреналіну нейронами симпатичної нервової системи та хромафінними клітинами наднирників. Незважаючи на те, що більша частина медіатора в цих органах в подальшому зазнає перетворення на норадреналін, припускають, що дофамін також може виділятися в загальну систему циркуляції як самостійний продукт [23].

1.1.1. Особливості метаболізму дофаміну

Дофамін, або 2-(3,4-дигідроксифеніл)-етиламін, хімічна формула – $C_8H_{11}NO_2$, — біогенний амін (катехоламін), що є попередником епінефрину (адреналіну) та норепінефрину (норадреналіну) (Рис. 1.1).

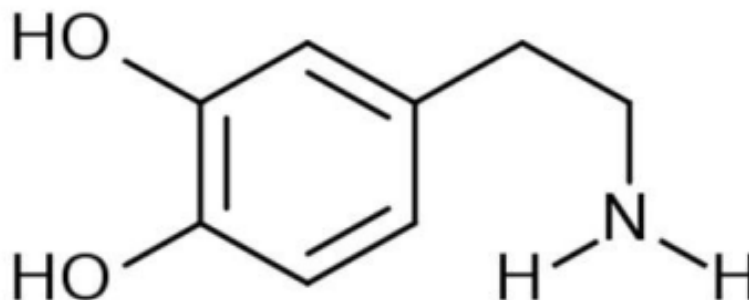


Рис. 1.1. Формула дофаміну

У центральній нервовій системі дофамін виконує функцію нейромедіатора. Він є важливою частиною «системи заохочення», так як викликає почуття задоволення, чим впливає на процеси мотивації і навчання. Дофамін виробляється у великих кількостях під час позитивних, за суб'єктивною оцінкою людини, переживань. Дофамін відіграє важливу роль в забезпеченні когнітивної діяльності, так як активація дофамінергічної передачі необхідна для переключення уваги людини з одного етапу когнітивної діяльності на інший. Також в організмі дофамін відіграє роль гормону, впливаючи на серцево-судинну, ендокринну, сечостатеву системи [24].

Процес синтезу дофаміну (Рис. 1.2) локалізований в цитоплазмі. При гідроксилюванні L-тироzinу (який синтезується з фенілаланіну) під дією

ферменту ТН утворюється L-ДОФА з наступним його перетворенням у дофамін за допомогою L-ДОФА-декарбоксілази.

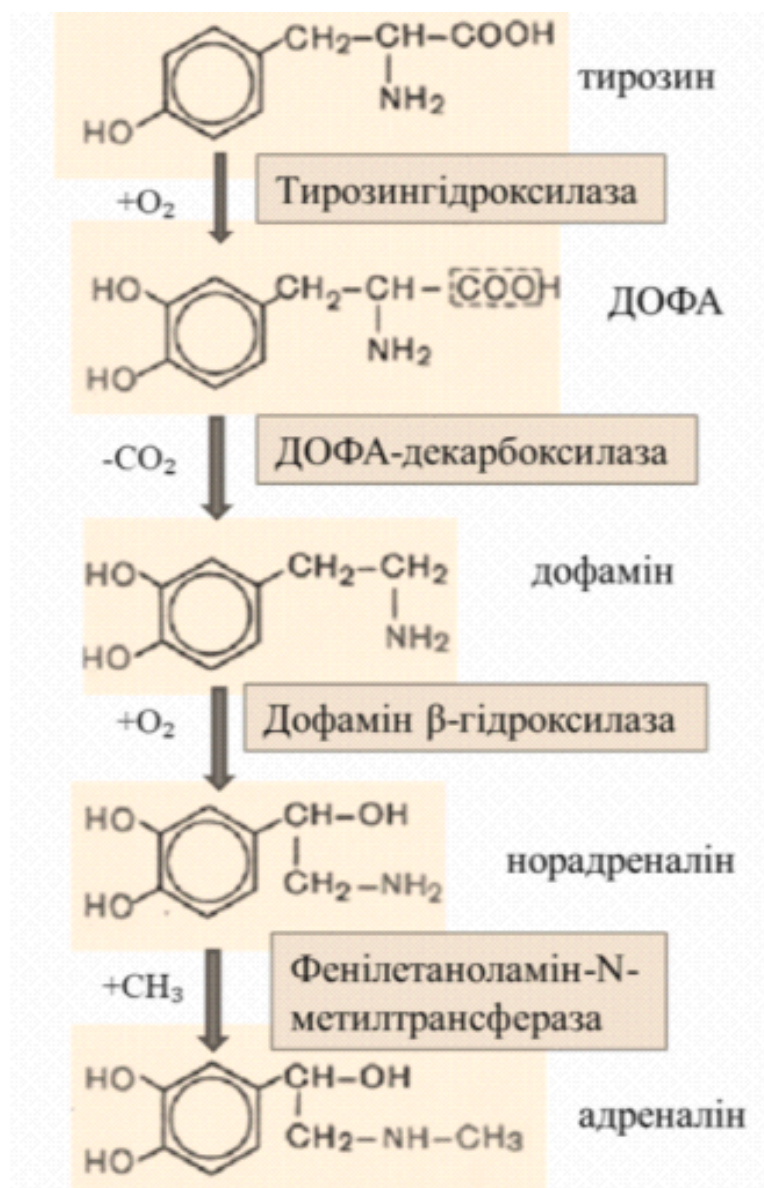


Рис. 1.2. Процес синтезу дофаміну

Під дією β-гідроксилази дофамін може перетворюватись на норадреналін, з якого за допомогою фенілетаноламін-N-метилтрансферази синтезується адреналін [24].

Реакція, що каталізується ТН, є лімітуючою для всього каскаду. ТН відіграє надзвичайно важливу роль в організмі; так, миші, нокаутовані по гену ТН, були нежиттєздатними. Дефіцит ТН у людей описується як аутосомальна рецесивна дистонія, чутлива до ДОФА, або дитячий паркінсонізм. Він викликається міссенс-мутаціями в гені ТН чи його промоторній ділянці; мутації з більш вираженим впливом на протеїн не є сумісними з життям [25].

Синтезований нейроном дофамін накопичується у везикулах. Цей процес називається протон-спряженим транспортом – у везикулу за допомогою протон-залежної АТФази накачуються йони H^+ , і при їх виході за градієнтом у везикулу потрапляють молекули дофаміну. Далі дофамін виводиться в синаптичну щілину. Частина його бере участь в передачі нервового імпульсу, діючи на дофамінові рецептори постсинаптичної мембрани, а частина повертається в пресинаптичний нейрон за допомогою дофамінового транспортера. Дофамін, що повернувся в клітину, може розщеплюватись за допомогою MAO.

ДАТ (dopamine active transporter, SLC6A3) – трансмембранний протеїн, що транспортує дофамін з парацелюлярного простору до клітини. Особливо важливу роль це відіграє в мозку при регуляції сигналу, опосередкованого дофаміном. Зменшення рівня ДАТ спостерігається з віком, і, скоріш за все, є причиною вікових змін у кількості вільного дофаміну. Вважається, що ДАТ залучений до розвитку багатьох хвороб, пов'язаних з дофаміном, серед них синдром дефіциту уваги і гіперактивності, біполярне порушення, клінічна депресія та алкоголізм. При позбавленні мишей гену ДАТ зростає кількість позаклітинного дофаміну, при цьому зменшується кількість дофаміну в клітині і кількість дофамінових рецепторів [26].

Walker та співав. [27] показали, що дофамін-опосередковане інгібування моторики товстої кишки є збільшеним в ДАТ-нокаутованих мишей, що узгоджується з периферичною гіпердофамінергією. У дітей, хворих на синдром нестачі ДАТ (аутосомальне рецесивне захворювання, що викликається мутаціями в гені SLC6A3), крім порушення рухового і когнітивного розвитку, вторинних медичних ускладнень і зменшення тривалості життя, спостерігались також порушення роботи ШКТ – гастро-езофагальний рефлюкс, закріп, надмірне слиновиділення, проблеми травлення, затримка набирання ваги. Також спостерігалися порушення сну, ортопедичні ускладнення і часті пневмонії [28]. Прояви хвороби нагадують подібні до таких при паркінсонізмі.

Інактивація молекул дофаміну здійснюється шляхом їх деградації. Вона може відбуватися шляхом окисного дезамінування за участі MAO або шляхом O-метилування за участі катехоламініотрансферази (КОМТ). Вибір того чи іншого шляху метаболізму залежить від локалізації специфічних ферментів. Так, MAO асоційована з зовнішньою мітохондріальною мембраною і працює переважно всередині клітин, у той час як КОМТ може бути пов'язана із плазматичною мембраною клітини або розміщуватися у вільному стані в цитоплазмі. Кінцевим продуктом метаболізму дофаміну за участі MAO і КОМТ є гомованілінова кислота [29].

1.1.2. Дофамінові рецептори

Фізіологічна дія дофаміну опосередковується через відповідні рецептори. На даний момент відомо 5 типів таких ДР: D1, D2, D3, D4 та D5, які характеризуються відмінностями в сигнальних механізмах і чутливістю до різних інгібіторів. Виділяють два основних класи рецепторів до дофаміну:

Д1-подібні і Д2-подібні. Обидва класи належать до суперродини рецепторів, сполучених із G-білками. Поділ на класи обумовлений здатністю цих рецепторів чинити різний вплив на активність аденілатциклази.

До групи Д1-подібних ДР відносять Д1- і Д5-ДР, які стимулюють аденілатциклазу, що призводить до підвищення рівня цАМФ у клітині, причому Д5-ДР характеризуються вищою афінністю до дофаміну порівняно з Д1. Д2-подібні ДР, які включають в себе Д2, Д3 і Д4-ДР, в свою чергу, інгібують активність аденілатциклази і роботу Ca^{2+} -каналів, водночас активуючи при цьому K^{+} -канали [30]. Крім того, Д3-ДР також регулюють функціонування інших внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, у тому числі через вплив на ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase; кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами) та протеїнкіназу В/Akt за участю G-білок-залежних або незалежних каскадів [31].

Спільною характеристикою всіх ДР є їх здатність до взаємодії з іншими рецепторами, допоміжними білками з утворенням функціонально унікальних гетеромерних комплексів, що значно розширює арсенал їх функціональних властивостей [32].

ДР широко розповсюджені як у головному мозку, так і на периферії. Найвищий рівень Д1-ДР у головному мозку показаний у стріатумі, прилеглому ядрі, чорній субстанції, нюховій цибуліні. Нижча щільність спостерігається в гіпокампі, мозочку, в ділянках таламуса та гіпоталамуса. Д5-ДР експресуються в незначній кількості в декількох ділянках мозку, зокрема в області пірамідальних нейронів префронтальної кори, премоторної кори, чорної субстанції, гіпоталамуса та гіпокампа [33].

Найвищі рівні Д2-ДР були виявлені в стріатумі, прилеглому ядрі і нюхових горбках. Також рецептори цього типу містяться в значних кількостях у чорній субстанції, вентральній області покрівлі, гіпоталамусі

[34]. D3-DR мають більш обмежений характер розподілу, найвищий рівень їх експресії спостерігається в межах оболонки прилеглого ядра, нюхових горбків, оболонки Кахела. Важливо відмітити низький рівень експресії рецепторів даного типу в стріатумі, чорній субстанції та вентральній ділянці покрівлі [35]. D4-DR загалом характеризуються найнижчим рівнем експресії в головному мозку [36].

1.1.2.1. Джерело дофаміну та локалізація дофамінових рецепторів в шлунково-кишковому тракті

На сьогоднішній день виділяють кілька потенційних джерел надходження дофаміну, який чинить вплив на функціонування ШКТ.

Регуляція роботи кишечника може здійснюватися за рахунок дофамінергічної системи шляхом передачі сигналів від ЦНС за допомогою симпатичних та парасимпатичних нервових волокон вегетативної нервової системи. Симпатичні впливи реалізуються через відповідні спинномозкові нерви, у той час як парасимпатична іннервація відбувається за участі блукаючого нерва. Волокна обох типів взаємодіють із нервовими закінченнями слизової оболонки кишки в межах ентеральної нервової системи. У свою чергу клітини ентеральної нервової системи секретують понад 30 різних нейротрансмітерів, у тому числі й дофамін [10; 37].

Відомо, що майже 40% дофаміну крові має периферичне походження, в тому числі з ШКТ [3]. Дослідження на симпатеکتомованих тваринах, виявлення ТН в не-нейрональних клітинах (епітеліальних, м'язових, ендотеліальних, лейкоцитах), а також численні фармакологічні експерименти та використання нокаutowаних мишей встановили існування периферичної дофамінергічної системи [3].

Крім того, дофамін синтезується епітеліальними клітинами слизової оболонки кишечника. В них виявлено підвищення активності декарбоксилази ароматичних амінокислот - одного з ферментів, який необхідний для синтезу дофаміну [38].

У периферичній нервовій системі ДР найчастіше можна зустріти в нирках, надниркових залозах, симпатичних гангліях, ШКТ, кровеносних судинах і серці [33].

Дослідження показали наявність всіх п'яти типів ДР у ШКТ мишей, зокрема, у шлунку, в дванадцятипалій кишці, клубовій кишці, проксимальному і дистальному відділах товстої кишки. При цьому, Д1, Д2, Д3 і Д5-ДР були виявлені в шарі повздожних м'язів стінки травного каналу, в той час як в слизовій оболонці кишечника були ідентифіковані Д1, Д3, Д4 та Д5-ДР. Відсутність Д2-ДР в межах слизової оболонки може пояснюватися тим, що вони локалізовані на поверхні нейронів ентеральної нервової системи. Аналогічним чином можна пояснити відсутність Д4-ДР у межах м'язової оболонки кишечника і припустити їх нейрональну локалізацію. Для Д1, Д3 та Д5-ДР характерною є як нейрональна, так і позанейрональна локалізація [39].

За своєю структурою Д3-ДР є високогомологічними до Д2-ДР. Головною їх відмінністю є ділянка алостеричного центру, призначена для зв'язування специфічних до кожного з цих рецепторів лігандів [40]

На даний час вважається, що саме Д2-ДР є головним медіатором ендогенних впливів дофаміну в ШКТ [41], однак останнім часом з'являється все більше переконливих доказів на користь того, що не менш важливу роль у цих процесах відіграють і Д3-ДР [42].

1.1.3 Роль дофаміну в регуляції ендотеліальної проникності

Дослідження останніх років на моделях раку молочної залози та товстої кишки показали, що дофамін, через активацію D2-ДР ендотеліальних клітин, здатен пригнічувати VEGF-зумовлену проникність кровоносних судин [43; 44]. Більш того, у мишей з відсутнім геном D2-ДР чи мишей з фармакологічно-зниженим рівнем дофаміну спостерігалось значне підвищення рівня фосфорилювання рецептора чутливого до VEGF – VEGFR-2, що є центральним компонентом в механізмі VEGF - викликаній проникності кровоносних судин. Активація D2-ДР, навпаки, зменшувала фосфорилювання VEGFR-2 та, відповідно, пригнічувала VEGF-стимульовану проникність кровоносних судин [43]. В ураженій слизовій хворих на ЗЗК визначається знижений рівень попередника дофаміну 3,4-діоксіфеніланіну (L-DOPA) та дофаміну [17]. Подібний ефект спостерігається на експериментальних моделях ВК [45]. Крім того, у пацієнтів з рефракторною (нечутливою до традиційних схем лікування) хворобою Крона спостерігається поліморфізм в гені, що кодує D2-ДР. Цей поліморфізм був асоційований зі зниженням щільності D2-ДР [46].

Не дивлячись на наявність цих описових досліджень, роль дофаміну/D2-ДР в патогенезі ЗЗК та зокрема в VEGF/VPF-викликаній проникності кровоносних судин при даній патології залишається недостатньо з'ясованою. Проте, відомо, що активація D2-ДР на ендотеліальних клітинах пригнічує VEGF-зумовлене підвищення проникності кровоносних судин, зменшує набряк та забезпечує їх стабілізацію на моделях канцерогенезу [47] та при синдромі гіперстимуляції яєчників [48]. В ранніх роботах проф. Сабо, який є нашим колаборатором, було виявлено, що агоніст D2/D3-ДР бромокриптин прискорює загоєння дуоденальних виразок [14].

1.1.4. Дофамін – регулятор імунної відповіді

Значний інтерес викликають дослідження зв'язків та взаємного впливу імунної та нервової систем, які найчастіше реалізуються через гіпоталамо-гіпофізарну систему та завдяки симпатичній чи парасимпатичній іннервації первинних і вторинних лімфоїдних органів. Одними з найважливіших медіаторів, які беруть участь у таких взаємодіях, є катехоламіни, а саме дофамін та норадреналін, які виділяються адренергічними синаптичними терміналями [49]. Їх дія реалізується за рахунок взаємодії даних нейромедаторів, зокрема дофаміну, з відповідними рецепторами, які розташовуються на поверхні клітин імунної системи. Тому порушення у функціонуванні дофамінергічної системи можуть бути пов'язані з розвитком аутоімунних захворювань і навіть раку [50].

За результатами чисельних досліджень було показано, що імунні клітини, а саме дендритні клітини, Т клітини, В клітини та макрофаги здатні синтезувати дофамін [51]. Також було показано, що дендритні клітини мають весь необхідний арсенал для синтезу та накопичення дофаміну, який, в свою чергу аутокринно стимулює ДР. Залежно від ДР, що стимулюються на дендритних та Т клітинах, дофамін сприяє диференціації CD4⁺ Т клітин у Th1 або Th17 запальні клітини. Регуляторні Т клітини також можуть синтезувати велику кількість дофаміну, що інгібує їх супресивну активність через аутокринну дію, опосередковану ДР. Враховуючи вищенаведене, логічно припустити, що дофамін опосередковує імунну відповіді через дію на основні клітини вродженого та набутого імунітету. Отже, дофаміновий сигналінг може бути основною рушійною силою аутоімунної відповіді [10].

Показано зв'язок між зміною рівня дофаміну в головному мозку мишей на фоні розвитку таких аутоімунних захворювань, як розсіяний склероз,

системний червоний вовчак, а також у тканинах пацієнтів із ревматоїдним артритом [52].

1.2. Патогенез запальних захворювань кишечника

ВК та ХК, що є запальними хронічними хворобами невідомої етіології, відносять до запальних захворювань кишечника. Дані кишкові патології відзначаються хронічним перебігом, схильністю до частих рецидивів і тяжких ускладнень (як кишкових, так і позакишкових), а також високим рівнем інвалідизації [53]. Поширеність даних хвороб у світі відрізняється, залежно від регіону; середня частота ВК змінюється від 30 до 240 на 100 тис. населення, а ХК – від 10 до 150 на 100 тис. населення. Щорічний приріст ВК складає 5-30 випадків на 100 тис. населення, а ХК – 5-20 випадків на 100 тис. населення [54].

ЗЗК є соціально значимим питанням, адже близько 50% хворих на ЗЗК знаходяться у працездатному віці. ЗЗК займають одне з провідних місць за тяжкістю перебігу та кількістю рецидивів та ускладнень [55]. Однак, ВК та ХК відрізняються між собою за ступінню та місцем уражень. А саме, для ВК характерним є запалення слизового шару товстої кишки і зрідка ураженнями підслизового шару. ХК характеризується трансмуральним сегментарним ураженням різних відділів ШКТ. Основними клінічними проявами даної групи хвороб є діарея з домішками крові та слизу, тенезми, абдомінальний біль, розлади метаболізму, симптоми, характерні для ендотоксемії тощо. Наразі виникнення ЗЗК пов'язують з декількома факторами, серед яких основну роль відіграють порушення імунної відповіді хазяїна на бактеріальні антигени у генетично схильних осіб. Виділяють такі патогенетичні фактори, як 1) антигени бактерій у товстій кишці; 2) порушення імунорегуляції; 3)

порушення цілісності кишкового бар'єру, що надає доступ бактерій до глибоких шарів епітелію і викликає контакт з власними імунними клітинами хазяїна [54]. Генетичний фактор розвитку ЗЗК є важливою складовою, адже близько 20% хворих на дані захворювання мають родичів, які також хворіють на ЗЗК [56]. Шанси набути ЗЗК до повнолітнього віку зростають аж до 52% у дитини, якщо обидва з її батьків хворіють на ХК або ВК [57]. У монозиготних близнюків конкордатність при ХК становить 47-58%, тоді як при ВК вона значно нижча (6-17%) [58]. Відомо, що локуси схильності до ЗЗК знаходяться на 1, 3, 4-7, 10, 12, 16 та 19-й хромосомах, серед яких найбільш вивченим є локус на 16-й хромосомі, що називається NOD2/CARD15. NOD2/CARD15 експресується на моноцитах і активує нуклеарний фактор $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), що запускає імунну відповідь на запальну реакцію [59].

1.2.1 Кишковий бар'єр та його роль в патогенезі запальних захворювань кишечника

Кишковий бар'єр складається з товстого шару слизу, який секретується келихоподібними клітинами та шару епітеліальних клітинта підслизової основи, що містить лейкоцити, які володіють певним діапазоном регуляторних та ефекторних функцій. Окремі елементи слизового бар'єру можуть змінюватися в різних його ділянках під впливом екологічних чинників [60].

Приепітеліальний шар є першим фізичним та хімічним бар'єром для мікроорганізмів та чужорідних шкідливих речовин; також сприяє збереженню зволоженої поверхні слизової оболонки і змащує її, створюючи оптимальні умови для переміщення речовин просвітом кишки. Крім того, він

забезпечує процеси обміну газами, водою та поживними речовинами між епітелієм та вмістом просвіту кишки [61].

Епітеліальні клітини забезпечують структурний бар'єр, синтезуючи переважну більшість компонентів слизу. Також вони є датчиками, які приймають і передають сигнали від зовнішнього середовища, регулюючи таким чином функціонування систем вродженого та адаптивного імунітету. Клітини підслизової слизової оболонки можуть проходити крізь епітеліальний бар'єр, виробляти певні компоненти слизу і модулювати функції епітеліальних клітин, зокрема і секрецію слизу останніми.

До складу слизового бар'єру товстої кишки входять три групи компонентів: муцини (глікопротеїни), неспецифічні антимікробні речовини та імуноглобуліни. До неспецифічних антимікробних сполук належать α -дефензини, лізоцим, ангіогенін-4, лектини, секреторна фосфоліпаза А2, ліпополісахарид-зв'язувальний білок, коллектин, гістамін. Специфічні антимікробні речовини представлені секреторними імуноглобулінами А, імуноглобулінами класів G та M [62].

Однак основним компонентом слизового бар'єру є молекули специфічних O-глікозильованих глікопротеїнів, що надають слизу в'язкості. На сьогоднішній день відомо 21 тип муцинів, які вибірково локалізуються в різних відділах ШКТ.

За функціональними особливостями глікопротеїни слизу товстої кишки поділяють на 2 групи: гель-формуєчі (MUC2, MUC5AC, MUC6), які безпосередньо відповідають за утворення слизового бар'єру на поверхні епітеліальних клітин, та мембранозв'язані (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15 - MUC17). Функції останніх поки що достеменно не

встановлені, однак припускають, що вони беруть участь у функціонуванні сигнальних шляхів у процесах, пов'язаних з розвитком пухлин [63].

Муцини слизу – високоглікозилізовані сполуки, які димеризуються за рахунок утворення дисульфідних містків завдяки наявності у своїй структурі цистеїн-збагачених регіонів [62]. Крім того, до складу білкової компоненти глікопротеїнів входять специфічні домени, що містять амінокислотні залишки серину, треоніну та проліну та які служать потенційними сайтами O-глікозилування [64].

Синтез і зберігання муцинів здійснюються у цитоплазмі келихоподібних клітин. Глікопротеїни акумулюються в клітинах у вигляді гранул, які в подальшому транспортуються до апікальної частини мембрани клітини і секретуються в просвіт кишки шляхом екзоцитозу [62]. Виділяють два типи екзоцитозу муцинів: конститутивний (базальна секреція) та регульований екзоцитоз. Процес базальної секреції характеризується безперервним синтезом і вивільненням окремих муцинових гранул. Регульований екзоцитоз відбувається під впливом специфічних агентів, які сприяють швидкому вивільненню центрального пулу глікопротеїнів [61].

Синтез і секреція муцинів відіграють важливу роль у підтриманні цілісності слизового бар'єру. Ці процеси регулюються мікробіотою, продуктами життєдіяльності мікробіоти, токсинами, цитокінами та іншими факторами [65].

Найважливішим серед глікопротеїнів слизу товстої кишки є муцин, який кодується геном *MUC 2* і синтезується келихоподібними клітинами слизової оболонки. Кожна субодиниця цього білка містить понад 5000 амінокислот, на долю яких припадає понад 70% маси глікопротеїну. Димеризація цих субодиниць відбувається в ендоплазматичному ретикулумі, в той час як в

апараті Гольджі здійснюються процеси глікозилування та подальшої олігомеризації глікопротеїнів з утворенням складних мультимерних структур [60].

MUC 2 відіграє ключову роль у захисті кишкового бар'єру від несприятливого впливу мікроорганізмів. Показано, що у щурів, нокаутованих за геном *MUC 2*, значно порушуються процеси формування слизового бар'єру, що, в свою чергу, призводить до більш інтенсивної колонізації ділянки товстої кишки патогенними мікроорганізмами у порівнянні з інтактними тваринами. Окрім того, ці процеси супроводжуються зростанням площі макроскопічного ураження епітелію, потовщенням товстої кишки, зменшенням розмірів сліпої кишки, а інколи призводять навіть до виникнення місцевих виразок [66].

Важливим структурним компонентом молекул муцинів є вуглеводний залишок, компоненти якого збираються на білковій молекулі шляхом O-глікозилування. До того ж, глікопротеїни можуть попередньо зазнавати N- та C-глікозилування, яке відбувається в межах ендоплазматичного ретикулулу [67].

Загалом масова частка вуглеводного компоненту у складі муцинів може варіювати та часто досягати показника 80% від загальної маси глікопротеїну [64].

Олігосахаридний компонент муцинів представлений гексозами (глюкоза, галактоза, маноза), сульфатованими моносахаридами, фукозою, гексозамінами та сіаловими кислотами, які формують певні структурні ансамблі та угруповування.

Формування олігосахаридного компоненту муцинів відбувається в процесі O-глікозилування через приєднання N-ацетилгалактозаміну (GalNAc) до гідроксильних груп серину і треоніну. Наступний етап синтезу

полягає у подовженні молекули в С3- або С6-положеннях моносахаридів з формуванням корових структур. Характерною особливістю глікопротеїнів MUC2 людини є приєднання сілової кислоти в С6-положенні GalNAc. Це призводить до термінації відповідної гілки у складі олігосахаридного комплексу. Тому подальше подовження олігоцукрів стає можливим лише в С3-положенні за рахунок приєднання залишків N-ацетилглюкозаміну та галактози [64].

Окрім сілових кислот, термінальне положення у складі олігосахаридних комплексів також займають залишки фукози та сульфатовані моносахариди. Сульфатування та сілування олігосахаридів муцинів забезпечує додаткову стійкість слизу до руйнування бактеріальними глікозидазами [64].

Комплекси олігосахаридів, локалізовані на великих центральних глікозильованих доменах муцинів, є численими потенційними лігандами до мікробних адгезинів, здатних зв'язувати та іммобілізувати бактерії, запобігаючи їх негативному впливу на епітелій. Крім того, олігосахаридні компоненти муцинів слизу можуть бути використані як джерело енергії деякими синантропними мікроорганізмами, які містяться в межах поверхневого шару слизу [62].

1.2.1.2 Роль ендотелію та ендотеліальної проникності в розвитку запальних захворювань кишечника

Відомо, що ендотелій складається з ендотеліальних клітин, що знаходяться на люмінальній поверхні судин. У великих судинах під шаром ендотеліальних клітин знаходиться шар гладком'язових клітин. Основна функція ендотеліальних клітин це селективна дифузія молекул, а саме

забезпечення непроникності малих водорозчинних молекул до м'язового шару, в той час як жиророзчинні молекули здатні швидко дифундувати крізь ендотелій. Транспорт речовин крізь ендотелій залежить від багатьох факторів, а саме: наявності рецепторів на мембранах клітин, слабкості міжклітинних взаємодій між клітинами ендотелію капілярів, мембранним зарядом клітин ендотелію та складу протеїнів матриксу субендотелію [68]. Відомо два основних шляхи транспорту розчинів крізь ендотелій: 1) парацелюлярна дифузія, 2) везикулярний транспорт, опосередкований рецептор-лігандними взаємодіями чи з залученням кавеол. Проникність судин кишечника є більш високою ніж, наприклад, проникність судин мозку, але є нижчою, ніж проникність судин печінки та селезінки, що пов'язане з різною кількістю міжклітинних контактів [69]. Загалом було описано три типи ендотеліальної проникності, а саме: 1) базальну ендотеліальну проникність нормальних тканин; 2) гостру ендотеліальну гіперпроникність та 3) хронічну гіперпроникність судин, що є характерною для аномального ангиогенезу [70]. Базальна проникність є характерною для капілярів, гостра васкулярна гіперпроникність виникає за короткочасної дії гістаміну, серотоніну, VEGF-A. Хронічна гіперпроникність розвивається за довгострокового впливу факторів, що збільшують проникність і характеризується змінами у структурі та функціонуванні венул. Трансміграція нейтрофілів є одночасно і першопричиною, і наслідком підвищеної проникності судин, а саме порушення функції ендотелію викликає діapedез нейтрофілів, які, в свою чергу, виділяють цитокіни, АФК і фактори росту. Ці процеси призводять до підвищення тирозинового фосфорилування FAK (focal adhesion kinase) у клітинах ендотелію, що, в свою чергу, запускає Ras-ERK1/2 сигнальний шлях, що результує дисоціацією ендотеліальних клітин від матриксу та MLCK-залежними актин-міозиновими скороченнями клітин [70].

Було показано, що ВК у тварин та людей характеризується збільшенням ендотеліальної проникності, що призводить до утворення набряку тканини. Ендотеліальні клітини зазнають помітних змін у відповідь на підвищену продукцію цитокінів та факторів росту, причому рівень eNOS знижується і це призводить до послаблення ендотелій-залежної вазодилатації, так як NO має протективну роль у розвитку ендотеліального запалення шляхом пригнічення матриксних металопротеїназ та молекул адгезії, стимульованих цитокінами [71]. Надмірний ангиогенез є важливим фактором, який опосередковує підвищення ендотеліальної проникності. У пацієнтів з ЗЗК співвідношення поділ/апоптоз у ендотеліальних клітинах порушується з переважанням поділу через залучення PI3K/Akt та MEK/Erk каскадів. В результаті цього утворюється “трубка” з ендотеліальних клітин, яка надалі зазнає ремоделювання у нову судину [72].

1.2.2. Особливості імунологічної відповіді за розвитку запалення в товстій кишці

Головним завданням імунної системи товстої кишки є запобігання потрапляння чужорідних патогенів з одночасною толерантністю до їжі та коменсальних мікроорганізмів. Цей імунний баланс підтримувався протягом мільйонів років спільного існування та взаємодії між хазяїном та мікробіотою товстої кишки і є необхідним для здорового розвитку та підтримання цілісності кишкового бар'єру [73]. Відповідно до сучасної теорії етіопатогенезу ЗЗК – вони виникають у разі порушення імунологічної відповіді на мікробіоту у генетично схильних пацієнтів. Імунна система товстої кишки відрізняється від системної за деякими аспектами, а саме: більшість кишкових ефекторних Т клітин є обученими до антигенів і менш

залежними від ко-стимуляції, також велика кількість кишкових Т клітин не експресує CD28 [74; 75]. Такі відмінності можуть впливати на деякі клінічні аспекти, наприклад, можуть пояснювати, чому абатасепт (CTLA4-Ig), що блокує ко-стимуляцію, не є ефективним при ХК та ВК, але є високоефективним при ревматоїдному артриті [76; 77; 78].

Деякі типи макрофагів та дендритних клітин відіграють центральну роль у функціонуванні слизового бар'єру товстої кишки. Не зважаючи на важливість макрофагів та дендритних клітин і їх підтипів у людей та мишей, експресія їх поверхневих маркерів обговорюється [79; 80]. Відомо, що одна фагоцитарна мононуклеарна клітинна популяція характеризується експресією рецептору хемокінів CX3CR1 [81; 82]. Більшість макрофагів у *lamina propria* експресують CX3CR1 [83] і їх субпопуляція локалізована близько до епітелію і пролонгує процеси детекції антигенів у кишковому просторі [84]. Генетична делеція гену, що кодує CX3CR1 призводить до зниження числа макрофагів *lamina propria* і підвищення транслокації коменсальних бактерій до мезентеральних лімфоїдних органів. Більше того, відсутність CX3CR1 призводить до підвищення важкості перебігу експериментального коліту, яка може бути полегшеною блокадою IL-17A специфічними антитілами або перенесенням CX3CR1-вмісних макрофагів [83]. Слід зазначити, що макрофаги Ly6Chi, що є попередниками резидентних CX3CR1 макрофагів, стають домінуючим типом клітин товстої кишки за рекрутування через рецептор до хемокінів CCR2 на тлі гострого коліту. Ці клітини підсилюють тол-подібний рецептор (TLR2) та NOD2, і тому являються відповідальними за бактеріальні продукти та їх розвиток у прозапальні ефекторні клітини. Їх видалення покращує гостре експериментальне запалення. Цікаво те, що трансплантовані Ly6Chi моноцити також потребували більше часу для набуття характерних ознак дендритних клітин, як, наприклад, міграційна

поведінка, спрямована до лімфоїдних органів разом з антиген-презентуючою функцією для диференціації наївних Т клітин [85]. Через цей шлях диференціації моноцитів, притаманний запаленій товстій кишці, важливо розглядати характеристики основних клітин імунної відповіді товстої кишки за норми та патології.

Макрофаги здорової товстої кишки не експресують CD14 [86] та є рефрактерними до запальної стимуляції, наприклад, через мікробні антигени, причому вони зберігають фагоцитуючі та бактерицидні функції [87]. Більше того, вони експресують протизапальні цитокіни, такі, як IL-10 і відповідають за диференціацію Treg клітин, супресуючи Th1 та Th17 імунітет, що забезпечується дендритними клітинами [88]. CD14-негативні макрофаги у *lamina propria* відповідають за захист від патогенів і в той же час запобігають надлишковій імунній відповіді. ХК характеризується присутністю іншої популяції макрофагів у товстій кишці, яка експресує маркери і макрофагів, і дендритних клітин (CD14, CD33, CD68, CD205, CD209) і яка продукує велику кількість прозапальних цитокінів, таких як IL-23, фактор некрозу пухлин α (TNF α) та IL-6. Слід зазначити, що ці CD14 макрофаги впливають на продукцію IFN- γ , а не IL-17, що здійснюється мононуклеарними клітинами *lamina propria*, залежними від IL-23 та TNF- α [89; 90].

Терапія анти-TNF α антитілами при ХК та ВК спрямована проти-TNF- α запальних макрофагів (а також Т клітин), пов'язаних з індукцією регуляторних макрофагів, Т клітин та моноцитів, активованих апоптозом [91]. Також блокада IL-6 через анти-IL-6R антитіла показала перспективний результат на активній стадії перебігу ХК [92], що вказує на важливість “запальних” міелоїдних клітин в патогенезі ЗЗК.

Врешті-решт, макрофаги, ізольовані з периферичної крові пацієнтів з ХК характеризувалися порушеною гострою запальною відповіддю

(включаючи TNF- α) проти *E.coli* та агоністів тол-подібних рецепторів (TLR), асоційованих зі зниженою інфільтрацією нейтрофілів та знищенням деактивованих та мічених *E.coli*, введених в передпліччя [93].

На противагу первинним фагоцитуючим макрофагам, дендритні клітини є спеціалізованими антиген-презентуючими клітинами, які можуть навчати наївні Т клітини та індукувати їх диференціацію у запальний (наприклад, Th1, Th17) або Treg фенотип. Дендритні клітини акумулюються в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з ЗЗК [94] та при експериментальних моделях коліту. Блокада взаємодії між дендритними та Т клітинами через блокаду CD40/CD40L, запобігає експериментальному коліту, викликаному Т-клітинами [95], що свідчить про роль дендритних клітин у запаленні товстої кишки. Деякі підтипи дендритних клітин наразі є добре описаними. Наприклад, CD103 дендритні клітини є критичними для підтримання гомеостазу товстої кишки [96], що пов'язане з їх роллю в диференціації Treg [97]. Генетична делеція *Tnfrif3* на дендритних клітинах викликала лімфоцит-залежний коліт, що розвивався спонтанно, а також спостерігався розвиток серонегативного анкілозуючого артрити [98]. Фермент A20, що трансформує убіквітин, кодується геном *Tnfrif3* (який розташований у локусі генетичного ризику ЗЗК) і може відігравати критичну роль у підтриманні гомеостатичної ролі дендритних клітин. На противагу до цієї загалом гомеостатичної ролі CD103 дендритних клітин, підтип, що експресує E-кадгерин (рецептор до CD103) був асоційованим з запаленням товстої кишки на експериментальних моделях. Дендритні клітини, позитивні на E-кадгерин, акумулюються у запаленій товстій кишці і характеризуються експресією TLR та продукують IL-6 та IL-23. Трансплантація запальних дендритних клітин *Rag*^{-/-} мишам (миші з імунодефіцитом) призводила до підвищеної Th17 відповіді [99]. Запальні дендритні клітини також відіграють

критичну роль у моделі виразкового коліту Tbx21^{-/-} Rag2^{-/-} (TRUC) [100]. За цієї моделі миші набувають коліт, що спонтанно розвивається і є схожим на ВК людини. А саме, TNF α , що секретується CD103-негативними дендритними клітинами у TRUC мишей викликав IL-23-індуковану експресію IL-17, в той час, як нейтралізація TNF α , IL-23p19 або IL-17A покращувала перебіг хвороби [101].

1.3. Роль дофаміну в процесах виразкоутворення в шлунково-кишковому тракті

Традиційно дофамін сприймається як нейромедіатор, біологічно активна речовина, яка відповідає за вияв емоцій, задоволення, здатність відчувати біль, а також є важливим модулятором рухової активності організму.

Однак останнім часом, окрім класичних функцій, все частіше говорять про вплив дофаміну на функціонування травної системи. Існують переконливі докази його впливу, разом з іншими катехоламінами, на процеси регуляції моторики кишечника, всмоктування поживних речовин, функціонування компонентів вродженої імунної системи, ШКТ, а також на склад мікробіоти кишечника.

Крім того, під час розвитку деяких патологічних станів, таких як ЗЗК або хвороба Паркінсона, спостерігаються порушення процесів регуляції рівнів цих нейротрансмітерів, що, в свою чергу, може сприяти розвитку або ускладненню перебігу захворювань ШКТ [41]. Зокрема, в дослідженнях Szabo та ін. [15] було показано, що хворі, які страждають від психоневрологічних розладів (наприклад, шизофренії), пов'язаних зі зростанням активності дофамінергічної системи, характеризуються низьким рівнем захворюваності на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки, в той час як серед пацієнтів із хворобою

Паркінсона відмічається відносно висока частота поширення цієї патології. У чисельних дослідженнях інших авторів було показано, що дофамін діяв як протективний агент, попереджаючи розвиток стрес-індукованих шлункових виразок [102]. Відомо, що дофамін має антипухлинну та антивиразкову активність, опосередковану через інгібування експресії ростового фактору VEGF, який відіграє критичну роль в заживленні ран та виразок [103]. Ефективність агоністів дофаміну у загоєнні цистеамін-індукованих шлункових виразок була показана на різних моделях у щурів [14]. Протективний ефект дофаміну може бути зниженим через вплив його антагоністів, які загострювали виразкоутворення на різних моделях у щурів та мишей [104; 105]. Дофамін здатний впливати на різноманітні внутрішні органи [106-108], також його активність пов'язана з ефектами простагландинів та соматостатину [109; 110]. Отже, дофамін відіграє важливу роль в захисті органів за норми [111; 112] та патології [113]. Серед усіх ефектів дофамін на стан внутрішніх органів, найбільш вивченою є його роль у шлунковому захисті [106; 107]. Це можна пояснити широкою розповсюдженістю дофаміну в організмі людини та тварин, а також змінами дофамінергічної системи шлунку за умов стресу тощо [112]. Шлунок, як відомо, є органом, найбільш сприятливим до стресу. Зміни зв'язування дофаміну з ДР були показані на пацієнтах з виразковою хворобою шлунку [114]. Дофаміноподібні речовини, такі як бромокриптин та амантадин, сприяють індукції загоєння виразок у пацієнтів з виразковою хворобою шлунку [113].

Вражаючі результати лікування шлункових виразок були отримані на пацієнтах з виразковою хворобою шлунку, яким вводили дофаміноподібні речовини (ефективність 90% спостерігалася у групі пацієнтів, яким вводили амантадин, 87% ефективність – для групи пацієнтів, яким вводили

бромокриптин проти 77% ефективності для циметидину та 80% ефективності для фамотидину (обидва є H₂ блокаторами) [115; 116].

Показана наявність ДР у слизовій оболонці шлунка, а також їх роль у регуляції шлункової секреції. Результати експериментів з використання селективних агоністів та антагоністів периферичних D₁-ДР свідчать про антисекреторну та гастропротективну роль агоністів, у той час як антагоністи активують надмірну секрецію та сприяють розвитку виразкових процесів [52]. Аналогічні ефекти були продемонстровані у випадку стимуляції центральних дофамінергічних рецепторів [117].

Схожі результати були отримані в ході дослідження ролі D₃-ДР у процесах функціонування ШКТ. Введення клозапіну - селективного інгібітора цих рецепторів супроводжувалось надмірним пригніченням шлункової секреції, а також сприяло порушенню процесів загоєння стрес-індукованих ушкоджень слизової оболонки шлунка. В той же час використання селективного агоніста D₃-ДР 7-гідрокси-N, N-ди-n-пропіл-2-амінотетраліну (7-OH-DPAT) призводило до інгібування надмірної секреції хлоридної кислоти в шлунку, а також до зменшення ступеню стрес-індукованого ураження слизової оболонки шлунка [118].

Загалом, агоністи як центральних, так і периферичних ДР можуть виступати як гастропротективні агенти за умов як гострих (етанол-індукований стрес), так і хронічних (ЙА-індукований гастрит) пошкоджень слизової оболонки шлунка [118].

Знижений рівень L-DOPA та дофаміну визначається в ураженій слизовій товстої кишки хворих на ЗЗК [17] та при експериментальному ВК у щурів [18]. Це призводить до зниження співвідношення дофамін/ L-ДОФА у тканинах і може вказувати на зниження декарбоксилазної активності L-амінокислот. Це підтверджує гіпотезу про захисну роль дофаміну в кишечнику.

Захисний ефект можна пояснити послаблювальною дією, яку медіатор чинить на гладенькі м'язи кишки. Це, в свою чергу, перешкоджає утворенню виразок і розвитку запальних процесів у нижніх відділах ШКТ. Під час розвитку ВК ця властивість поступово втрачається через падіння рівня дофаміну, яке тягне за собою стимулювання синтезу та вивільнення із клітин імунної системи, що несуть на своїй поверхні ДР новосинтезованих та вже присутніх прозапальних цитокінів [41]. Більше того, поліморфізм Таq1АД2-ДР, що відповідає за зниження щільності рецепторів, асоційований з рефракторною ХК [46]. Це свідчить про можливу роль периферичної дофамінергічної системи в патогенезі ЗЗК і наголошує про важливість подальших досліджень в цьому напрямі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

У роботі були використані: 6% розчин йодоацетаміду (ЙА) у 1% розчині метилцелюлози (МЦ); 1% розчин МЦ; фарба Еванса (ЕВ, Evansblue, Sigma), 6% реактив Laemmli (Sigma, склад: гліцерол 20%, ДСН 2%, меркаптоетанол 5%, бромфеноловий блакитний 0,025%, ТРІС 63 мМ, рН 6,8), інгібітори протеаз (Sigma), PMSF (Sigma), інгібітори фосфатаз (ортованадат натрія (Sigma)), фарба “BioRad”, розчин АА (акриламід 30%, бісакриламід 0,8%), 10% розчин ДСН, TEMED, 10% розчин персульфату амонію, етиловий спирт, молекулярний маркер протеїнів в діапазоні 29-193 кДа, електродний буферний розчин (0,025 М Tris, 0,192 М гліцин, 0,1% SDS), буферний розчин для електропереносу Towbin (Tris 25 мМ, гліцин 192 мМ, метанол 20%, рН 8,3), буферний розчин TBST (Tris 10 мМ, NaCl 150 мМ, 0,05% Tween-20, рН 7,4), 1% розчин знежиреного сухого молока в буферному розчині TBST, 2% розчин БСА в TBST, первинні антитіла. ЙА, МЦ, гексадецилтриметил амоній бромід, о-діанізидин гідрохлорид, фарба Еванса, ФІТЦ-декстран, протеазний інгібітор та інші загальні аналітичні реагенти були придбані у Sigma (St. Louis, MO). Інгібітор фосфатаз (10 мМ ортованадат натрію 1:100 лізис-буферу), використаний у дослідженнях – Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA). Тирозинова гідроксилаза (ТН) (№2792) була з Cell Signalling Technology (Danvers, MA). Антитіла до дофамінового транспортеру ДАТ (1:250) (sc-14002), D2-R (1:250) (sc-5305), D3-R (1:250), ТН (1:1000), MAO-B (1:500), β -actin (1:500) (sc-47778), вторинні анти-мишачі (1:2500) та анти-кролячі антитіла (1:2500) для Вестерн-блот аналізу та імуногістохімії були з Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA). Антитіло до GAPDH (1:2000) було придбане в

EnCor Biotech (Alachua, FL). Для імуногістохімічного аналізу зразків товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом застосовували антитіла D3r12-p, D2r13-p (Alpha diagnostics), TH (Santa Cruz, sc-14007), DAT (Santa Cruz, sc-14002) у розведенні 1:50. Агоніст до D2-ДР (-)-квінпірол гідрохлорид та каберголін (Dostinex) були отримані від Sigma (USA) та Pfizer (USA) відповідно. Резиновий катетер Nelaton S-8 був від Rusch (Germany). Також були використані: домперідон (Домрид, Кусум Фарм) в дозі 2 мг/100 г, 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (МРТР) (Sigma, USA) в дозі 20 мг/кг.

2.2. Експериментальні тварини

Дослідження проведені на 261 білих нелінійних щурах-самцях з початковою масою 160-180 г, яких утримували в акредитованому віварію Навчально-наукового центру “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно зі “Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)”. Дослідження відповідають основним вимогам Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») та погоджені біоетичною комісією ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол №8 від 2.11.2015 р.

2.3. Моделювання експериментального коліту ректальним введенням SH-алкілатора - йодоацетаміду щурам

Експериментальний коліт викликали загальноприйнятим методом (після дефекації щурам ректально вводили 0,1 мл 6% ЙА, розведеного в 1% розчині МЦ). Щурів виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації через 0,5, 2, 6 годин та 3, 7 та 14 днів від моменту викликання коліту. Під час умертвління було видалено 7 см товстої кишки, яка була розрізана вздовж з протилежної від мезентерію боку та промита в холодному натрій-фосфатному буфері. Після чого у частини групи була зібрана слизова оболонка товстої кишки та занурена в рідкий азот для збереження нативної структури білків для наступного аналізу вмісту протеїнів методикою Вестерн-блот, а у другій частині зразки товстої кишки були використані для імуногістохімічного аналізу. Під час умертвління було проведено візуальне оцінювання макроскопічних ознак ВК, а саме: ступінь коліту (0-3), волога маса кишки (мг/7 см), втрата складчастості (мм), потовщення товстої кишки (мм), площа ураження (мм²). Також було оцінено клінічні показники хвороби: летаргію, діарею, втрату маси тіла, ІАХ (індекс активності хвороби). ІАХ складався з таких параметрів: втрата маси тіла та ступінь летаргії та діареї для показників 3 та 7 днів (Табл. 2.2.).

Таблиця 2.2

Шкала оцінювання індексу активності хвороби

Ступінь	% втрати маси тіла	Діарея	Летаргія
0	Немає	Нормальний стул	Нормальна

Продовження табл. 2.2

1	1-10	М'який або водянистий стул, що характеризується забрудненням невеликої (<1 см ²) ділянки навколо анусу	Трохи підняте волосся та забруднення
2	11-15	Жовтуватий колір волосся на животі ділянки > 1 см ² навколо ануса	Забруднення та знижені спонтанні рухи
3	>15	Жовтуватий колір волосся на животі, що спускається до грудної клітки	Тварина, що слабо рухається

2.4. Моделювання руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (MPTP)

Для дослідження ролі периферичних дофамінергічних нейронів у розвитку ВК у щурів був обраний загальноживаний метод руйнування дофамінергічних нейронів введенням нейротоксину MPTP (*1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин*) (Sigma, USA) [119]. За тиждень до початку експериментів щурів відсадили в окремі клітки для адаптації та вирівнювання рівня катехоламінів у крові. Клітки були почищені за 3 дні до початку експерименту. Тварин було поділено на 4 групи: .група I – контроль (на 1-й день вводили фізіологічний розчин у дозі 0,1 мл/щур, підшкірно, 4 рази кожні 2 год; на 7-й день вводили МЦ в дозі 0,1 мл/щур ректально, n=3). Щурам групи II на 1-й день вводили фізіологічний розчин у дозі 0,1 мл/щур,

підшкірно, 4 рази кожні 2 год; на 7-й день вводили 6%-ЙА ректально (n=3). Щурам групи III в перший день вводили МРТР в дозі 20 мг/кг підшкірно, 4 рази кожні 2 год; на 7-й день вводили МЦ в дозі 0,1 мл/щур ректально (n=3). Тваринам групи IV в перший день вводили МРТР в дозі 20 мг/кг підшкірно, 4 рази кожні 2 год; на 7-й день вводили 6%-ЙА ректально (n=3).

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на 18-й день експерименту. Проводили забір крові у пробірки з гепарином для подальшої ізоляції клітин. При умертвлінні було видалено 7 см товстої кишки від анального отвору. Проводився макроскопічний та мікроскопічний аналіз величини уражень, індекс активності хвороби. Слизова товстої кишки була зішкрябана та заморожена в рідкому азоті для подальшого дослідження рівня протеїну ТН методом Вестерн-блот аналізу. Також була видалена частина мозкової тканини в зоні середнього мозку для визначення рівня протеїну ТН.

2.5. Умови забору та використання біопсійного матеріалу пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом

Стан дофамінергічної системи пацієнтів, хворих на неспецифічний ВК (n=5), та у контрольній групі (n=5) (краї резекції кишки з відсутністю пухлинного росту, видалені при хірургічному втручанні на пацієнтах з колоректальним раком) проводили на архівних біопсійних зразках завантажених у парафін. Біопсія була мультифокальною – на 8-10 біоптатів вздовж прямої кишки та дистального відділу сигмовидної кишки. Гемостаз забезпечувався шляхом електрокоагуляції. Свіжий біопсійний матеріал поміщали в скляний посуд з буферним розчином 10% формаліну в об'ємі, що у 15 разів перевищував об'єм тканини для подальшого морфологічного дослідження відповідно до загальноприйнятої методики. За результатами

морфологічного дослідження було виключено зразки з ознаками малігнізації. За результатами ендоскопічного дослідження та клінічних даних встановлено діагноз неспецифічний виразковий коліт з 2-м та 3-м ступенем ендоскопічної активності та важким ступенем клінічного перебігу. Потім зразки заливали парафіном, нарізали мікротомом на фрагменти розміром не більше 5 мкм. Зразки були отримані від пацієнтів, які проходили стаціонарне лікування в Хмельницькій обласній лікарні (лікар-проктолог, к.м.н. Керничний В.В.), відповідно до рішення комісії з питань біомедичної етики ВНМУ МОЗ України (м. Вінниця) від 27.03.2015 і на підставі письмової згоди пацієнтів щодо використання біопсійного матеріалу для медико-біологічних досліджень.

2.6. Визначення ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів *in vivo*

Для кількісного вимірювання ендотеліальної проникності товстої кишки було використано фарбу Еванса, яка зв'язується з альбуміном і її текучість відображає підвищену ендотеліальну проникність макромолекул [120]. За 20 хв до аутопсії щурам інтраперитонеально вводили розчин уретану з розрахунку 115 мг/100 г щура. За 15 хв до аутопсії внутрішньовенно вводили фарбу Еванса з розрахунку 0,4 мг/100 г щура. Після аутопсії видаляли 7 см товстої кишки від анального отвору. Тупим скальпелем обережно зішкрябували поверхневі шари кишки, залишаючи серозну оболонку, та переносили слизову оболонку на фольгу, зважували та інкубували з 4 мл формаміду протягом 24 год при 50°C на шейкері. Вимірювали оптичну густину проби на спектрофотометрі при довжині хвилі 612 нм проти формаміду, перераховували відносно стандартів. Дані представляли як мг фарби/г слизової оболонки.

Для приготування стандартних розчинів фарби Еванса, готували водні розчини з концентрацією 0,1125, 0,045, 0,0225, 0,01125, 0,005625 та 0,003735 мг/мл, при кінцевому розведенні яких в формахіді ми отримали концентрації фарби Еванса 4,5, 1,8, 0,9, 0,45, 0,225 та 0,15 мкг/мл відповідно. Оптичну густину отриманих розчинів міряли на спектрофотометрі за довжини хвилі 612 нм проти формахіду.

2.7. Визначення епітеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів *in vivo*

Проникність епітеліального шару слизової оболонки товстої кишки вимірювали за концентрацією в плазмі крові флуоресцеїнізотіоціанат (FITC)-декстрану з молекулярною масою 3,0-5,0 кДа (Sigma, США), введеного перорально [121]. Перед початком експерименту щурів позбавляли їжі на 18 год, але вони мали вільний доступ до води. За 2 год до аутопсії щурам перорально вводили розчин PBS (рН=7,4) із розрахунку 20 мл/кг, що вміщував 22 мг/мл FITC-декстрану. Кров отримували кардіопунктурою, переносили в пробірки з EDTA, після чого центрифугували впродовж 20 хв. (3,000 rpm, T= 4°C). Концентрацію FITC-декстрану вимірювали в 100 мкл плазми крові на спектрофлуориметрі для мікропланшетів (NovoStar, BMGLABTECH Inc., США) при довжині хвилі збудження 485 нм та довжині хвилі випромінювання 520 нм. В якості стандарту використовували послідовне розведення FITC-декстрану в PBS: 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 нг/мл. Дані представлені у вигляді: нг/мл плазми.

2.8. Визначення загальної концентрації білка за методом Бредфорд

Для визначення загальної концентрації протеїнів використовували Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA) згідно з наданим протоколом, використовуючи протеїни в розведенні 1:2500. Як стандарт використовували БСА (Sigma) в концентраціях 1,42 мкг/мл; 2, мкг/мл; 4,26 мкг/мл; 5,68 мкг/мл; 7,1 мкг/мл; 9,94 мкг/мл; 14,2 мкг/мл. Концентрацію протеїнів в стандартах та зразках вимірювали на спектрофотометрі "BioTek, SynergyHT" при довжині хвилі 595 нм.

2.9. Вестерн блот аналіз

У пробірках змішували компоненти для приготування верхнього гелю (гель концентрування, склад: 10% розчин АА, 0,1% ДСН, 0,375% Тріс, рН 8,8, 0,04% TEMED, 1% АПС) та нижнього гелю (гель розділення, склад: 4% розчин АА, 0,1% ДСН, 0,125% Тріс, рН 6,8, 0,1% TEMED, 1% АПС). Каталізатор полімеризації TEMED і АПС додавали безпосередньо перед заливкою гелів у касети.

У касету заливали суміш для нижнього гелю та залишали для полімеризації на 40 хв. Після завершення полімеризації нижнього гелю заливали до верхньої межі касети компоненти верхнього гелю і відразу ж вкладали пластикову гребінку. Полімеризація верхнього гелю тривала 20 хв. Виймали гребінку, касету закріплювали у електрофоретичній камері та заповнювали систему електродним буферним розчином.

Екстракт протеїнів розморожували, змішували з розчином Laemmli та витримували на водяній бані впродовж 5 хв ($t=95^{\circ}\text{C}$), потім охолоджували до кімнатної температури. Досліджувані зразки завантажували у лунки із розрахунку 75 або 100 мкг загального протеїну, у одну із лунок завантажували суміш білків-маркерів молекулярної маси.

Електрофоретичне розділення протеїнів за молекулярною масою здійснювали за напруги 150V протягом 50-90 хв. Після цього вимикали пристрій, відчиняли касети і відділяли нижній гель.

Для переносу протеїнів на нітроцелюлозну мембрану спочатку щонайменше 5 хв витримували нижній гель і мембрани у буферному розчині Towbin. Після цього при закладанні касет формували сендвіч електропереносу в такій послідовності: губка, 3 листи фільтрувального паперу, гель, нітроцелюлозна мембрана, 3 листи фільтрувального паперу, губка. Протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани при напрузі 100V протягом 80 хв, використовуючи додаткове охолодження касетами з льодом і перемішуванням.

Після закінчення електропереносу фіксовані на нітроцелюлозній мембрані протеїни забарвлювали розчином барвника Пуансо.

Після електропереносу протеїнів мембрану промивали буферним розчином TBST та блокували активні ділянки мембрани 2% розчином БСА в TBST впродовж 30 хв. Готували розчин первинних антитіл в буферному розчині TBST у розведенні відповідно рекомендацій виробника: Були використані первинні антитіла проти TN (1:1000), MAO-B (1:500), Akt (1:500), phosphor-Akt(Ser473) (1:500), Src (1:1000), phosphor-Srcfamily(Tyr416) (1:750), DAT (1:250) D2-R (1:250), D3-R (1:250). Стандартизація вимірів була зроблена з використанням мишачих моноклональних антитіл до GAPDH (1:2000) або бета-актину (1:500). Кожен вестерн блот був повторений як мінімум два рази.

Нітроцелюлозну мембрану інкубували у розчині первинних антитіл за кімнатної температури протягом 2 год, тричі по 5 хв промивали в буферному розчині TBST і інкубували протягом 1 години у розчині вторинних антитіл, розведених у співвідношенні 1:500 у 1%-му розчині знежиреного сухого молока в буферному розчині TBST. Після цього мембрани промивали 7 разів по 5 хв у буферному розчині TBST, 5 хвилин інкубували у розчині TRIS (pH 8.5) та обробляли за допомогою розчину ECL з додаванням 6 мкл перекису водню (35%).

Свічення, яке виникало внаслідок хемілюмінесцентної реакції пероксидази хрому з субстратом, фіксували на фотопластинках фірми «Агфа» із використанням ряду експозицій та проявляли фотопластинки. Одержані зображення сканували з переведенням у формат цифрових зображень «TIFF». Оптико-денситометричний аналіз проводили з використанням спеціалізованого програмного забезпечення (програма «ImageStudioLite»).

2.10. Ізоляція поверхневого слизу товстої кишки щурів

Після умертвління було видалено ділянку товстої кишки довжиною 7 см починаючи від анального отвору. Кишку розрізали в поздовжньому напрямку з антимезентерального боку та промивали у фізіологічному розчині. Поверхневий слиз відділяли від шару епітеліальних клітин за допомогою розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну [122]. Для цього кожен пробірку з кишкою, яка містила 9 мл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну, перемішували на вортексі впродовж 4 хв, а потім центрифугували при 3000 об/хв впродовж 15 хв. Для подальших досліджень використовували осад та надосадову рідину загальним об'ємом 1 мл. Виділений слиз ресуспендували та гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера.

2.10.1. Визначення секреції слизу за ШИФ-реакцією на PVDF-мембрані

Слиз, в основному, складається із секреторних муцинів, тому для визначення рівня секреції слизу використовували ШИФ-реакцію. Для відокремлення шару мукозного гелю від поверхні товстої кишки 1 см дистального відділу товстої кишки (3 см від анального отвору) поміщали в пробірку з 2 мл 6Н N-ацетил-L-цистеїну та постійно струшували протягом 3

хв. Після цього вміст пробірки центрифугували впродовж 5 хв, 3000 RPM ($T = 4^{\circ}\text{C}$). 1 мл надосадової рідини видаляли, вміст пробірки ресуспендували та 500 мкл розчину переносили в чисті пробірки, заморожували при -20°C . Рівень глікопротеїнів слизу вимірювали за допомогою забарвлювання PVDF (Hybond-P, Amersham International, Little Chalfont, UK) мембрани розчином періодатної кислоти, згідно методу [123]. Спершу мембрану занурювали в 100% розчин метанолу на 2 хв, а потім у 80% розчин також на 2 хв. Після цього мембрану промивали в дистильованій воді, висушували фільтрувальним папером. 10 мкл зразку наносили на PVDF мембрану, яку попередньо поміщали на вологий фільтрувальний папір та витримували 10-15 хв до повного його поглинання. Мембрану промивали в дистильованій воді протягом 2 хв, після цього інкубували 10 хв в 0,5% KOH розчином в 70% етанолі і знову ополіскували в дистильованій воді. Далі мембрану занурювали в 0,5% розчин періодатної кислоти на 10 хв, промивали дистильованою водою і піддавали дії ШИФ-реагенту (основний фуксин 1 г, 20 мл 1N HCl, 1 г NaS_2O_5 , dH_2O 200 мл) протягом 15-30 хв при постійному струшуванні. Після цього мембрану двічі інкубували в 0,6% метабісульфіті натрію впродовж 3 хв і промивали в дистильованій воді також 3 хв. Після остаточного ополіскування в дистильованій воді мембрану висушували на відкритому повітрі 10 хв та сканували за допомогою сканера (Samsung SCX-4x21). Аналіз зображень проводили вимірюванням щільності позитивно забарвлених точок за допомогою програмного забезпечення для обробки зображень 'ImageStudioLite'.

2.10.2. Визначення концентрації загальних глікопротеїнів слизу за реакцією з реактивом Фоліна (за білковим компонентом)

Кількісне визначення загального вмісту глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів проводили за методом Романенко [124]. Оскільки глікопротеїни – це кислі білки, їх виділення проводили з використанням розчину 20%-ї сульфосаліцилової кислоти, після чого кількісно визначали у реакції з реактивом Фоліна. Компоненти реактиву Фоліна взаємодіють із залишками тирозину та триптофану в складі білка з утворення нестабільної комплексної сполуки синього кольору, яка переходить у молібденову синь.

В ході експерименту слиз спочатку розводили в 10 разів та інкубували з 200 мкл розчину 20%-її сульфосаліцилової кислоти впродовж 10 хв. Після цього зразки фільтрували. До отриманого фільтрату додавали 100 мкл розчину 5 %-ї фосфорновольфрамкової кислоти та інкубували протягом 15 хв, після чого центрифугували при 9000 об/хв впродовж 15 хв. Осад розчиняли в 200 мкл 0,1 н NaOH, додавали 130 мкл 10% NaOH та 50 мкл реактиву Фоліна.

Вимірювання оптичної густини проб здійснювали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра при довжині хвилі 630 нм проти контрольного зразку, який містив 200 мкл 0,1н NaOH, 130 мкл 10%-го NaOH та 50 мкл реактиву Фоліна. Концентрацію глікопротеїнів (мг/мл) вираховували за допомогою калібрувальної кривої, для побудови якої використовували розчини тирозину з концентраціями 40, 25, 20, 16, 10 та 5 мг/мл.

2.10.3. Визначення концентрації гексоз складі слизу

Концентрація гексоз поверхневого слизу товстої кишки щурів визначали орциновим методом [125]. Принцип методу полягає в тому, що після гідролізу слизу з хлоридною кислотою вивільняються гексози, які після

взаємодії з орциновим реактивом утворюють комплексну сполуку з рожевим забарвленням, інтенсивність якого пропорційна вмісту гексоз.

Слиз розводили у 10 разів та гідролізували з 4 н НСІ у співвідношенні 1:1 впродовж 1 год при 100°C. Після цього зразки центрифугували при 9000 об/хв впродовж 10 хв.

До 100 мкл надосадової рідини додавали 850 мкл орцинового реактиву, інкубували протягом 15 хв на водяній бані за температури 80°C, а потім охолоджували під проточною водою.

Вимірювання оптичної густини проб здійснювали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра при довжині хвилі 560 нм проти контрольного зразка, який містив 100 мкл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну та 850 мкл орцинового реактиву. Вміст гексоз (мкмоль/мл) визначали за допомогою калібрувальної кривої, для побудови якої використовували розчини манози з концентраціями 8; 5; 4; 2,5; 1 та 0,5 мкмоль/мл.

2.10.4. Визначення концентрації фукози у складі слизу

Концентрація фукози поверхневого слизу товстої кишки щурів визначали за методом Діше-Шеттлз [126]. Метод заснований на тому, що фукоза в кислому середовищі разом з солянокислим цистеїном дає жовте забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна вмісту метилпентози. Для з'ясування похибки на забарвлення, яке може викликатися іншими цукрами, оптичну густину визначали за довжин хвиль 396 нм та 430 нм.

Слиз розводили у 10 разів та гідролізували з 4 н НСІ у співвідношенні 1:1 впродовж 1 год при 100°C. Потім проби центрифугували при 7000 об/хв впродовж 10 хв.

До 100 мкл надосаду додавали 450 мкл розчину $H_2SO_4:H_2O$ у співвідношенні 6:1, витримували 10 хв при кімнатній температурі, після чого інкубувати протягом 3 хв на водяній бані за температури 100°C та різко охолоджували під проточною водою. До охолоджених проб додавали 10 мкл

3% розчину солянокислого цистеїну. Надалі зразки витримували 1 год при кімнатній температурі в темряві.

Вимірювання оптичної густини проб здійснювали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра при довжинах хвиль 396 нм та 430 нм проти контрольного зразку, який містив 100 мкл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну, 450 мкл H_2SO_4 та 10 мкл 3%-го р-ну солянокислого цистеїну. Різниця між показниками екстинції (E) $E_{396}-E_{430}$ відповідала вмісту фукози в дослідних зразках. Вміст фукози (мкмоль/мл) вираховували за допомогою калібрувальної кривої, для побудови якої використовували розчини фукози з концентраціями 12; 10; 8; 6; та 4 мкмоль/мл.

2.10.5. Визначення концентрації гексозамінів у складі слизу

Концентрація гексозамінів поверхневого слизу товстої кишки щурів визначали за методом Романенко [127], який базується на здатності гексозамінів у лужному середовищі при взаємодії з етилацетоном перетворюватися на похідні піролу, які з n-диметиламінобензальдегідом утворюють інтенсивне червоне забарвлення.

Слиз гідролізували з 8 н H_2SO_4 у співвідношення 1:1 протягом 5 год при $100^\circ C$. Потім центрифугували при 7000 об/хв впродовж 10 хв.

Відбирали 50 мкл надосаду та додавали 3 н NaOH для створення слабколужної реакції середовища. До 100 мкл нейтралізату додавали 100 мкл ацетилацетонового реактиву (2%-й розчин ацетилацетону в 0,5 н Na_2CO_3) та інкубували суміш на водяній бані протягом 15 хв за $100^\circ C$. Після охолодження до зразку додавали 200 мкл 96%-го етанолу та 50 мкл реактиву Ерліха. Реактив Ерліха містив 0,08 г n-диметиламінобензальдегіду, 3 мл 96 %-го етанолу та 3 мл концентрованої соляної кислоти.

Вимірювання оптичної густини проб здійснювали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра при довжині хвилі 540 нм проти контрольного зразка, який містив 100 мкл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну,

100 мкл ацетилацетонового реактиву, 200 мкл 96%-го етанолу та 50 мкл реактиву Ерліха. Вміст гексозамінів (мкмоль/мл) вираховували допомогою калібрувальної кривої, для побудови якої використовували розчини d-глюкозамінгідрохлориду з концентраціями 6; 4; 2; 1; 0,8 та 0,6 мкмоль/мл.

2.10.6. Визначення концентрації сіалових кислот у складі слизу

Концентрація сіалових кислот поверхневого слизу товстої кишки щурів визначали за методом Гесса [128], який полягає в тому, що сіалові кислоти вивільнюються в результаті гідролізу глікопротеїнів і утворюють забарвлені сполуки при нагріванні з оцтово-сірчанокислим реактивом.

Слиз гідролізували з 0, 5 н соляною кислотою у співвідношенні 4:1 впродовж 1 год при 80°C. До гідролізату додавали 100 мкл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти та інкубували на водяній бані при 100°C протягом 5 хв. Потім зразки охолоджували під проточною водою протягом 3 хв та центрифугували при 7000 об/хв впродовж 10 хв.

Для подальших досліджень відбирали 100 мкл надосаду та додавали до них 500 мкл оцтово-сірчанокислої суміші. Проби нагрівали на водяній бані 100°C впродовж 30 хв.

Після охолодження здійснювали вимірювання оптичної густини проб за допомогою мікропланшетного спектрофотометра при довжині хвилі 546 нм проти контрольного зразка, який містив 100 мкл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну та 500 мкл оцтово-сірчанокислої суміші. Вміст сіалових кислот (мкмоль/мл) вираховували за допомогою калібрувальної кривої, для побудови якої використовували розчини N-ацетилнейрамінової кислоти з концентраціями 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 та 0,1 мкмоль/мл.

2.11. Гістологічний та морфометричний аналіз

Для гістологічного та морфометричного дослідження були використані зразки товстої кишки щурів, які фіксували у 10 % формаліні для виявлення келихоподібних клітин та у фіксаторі Карнуа (склад: етанол 60%, хлороформ 30%, льодяна оцтова кислота 10%) - для виявлення тучних клітин (1 см товстої кишки в кожен фіксатор). Далі матеріал заливали у парафін за загальноприйнятою методикою. Потім виготовляли поперечні зрізи товщиною 5 мкм на роторному мікротомі (“ThermoScientific™ HM 325Rotary Microtome”).

Зрізи, отримані з матеріалу, фіксованого у формаліні, забарвлювали гематоксилином Бемера та еозином. Зрізи товстої кишки, отримані з матеріалу, фіксованого у фіксаторі Карнуа, забарвлювали альціановим синім (ТОВ "БиоВитрум", Росія) згідно інструкції виробника. Ці зрізи аналізували під мікроскопом з метою виявлення загальних морфологічних змін. Для морфометричного аналізу виготовляли цифрові мікрофотографії при збільшенні у 10 та 40 разів. Використовували мікроскоп Olympus System Microscope Model VX41 та фотокамеру Olympus Digital Camera C5050 Zoom (Японія). За допомогою комп'ютерної програми Image J вимірювали: товщину слизової оболонки, глибину крипт, висоту епітеліоцитів та площу поперечного перерізу їх ядер, площу поперечного перерізу келихоподібних клітин. Також підраховували кількість келихоподібних клітин та кількість гранул тучних клітин. Крім того, вимірювали товщину слизової оболонки товстої кишки.

2.12. Імуногістохімічний аналіз

Для імуногістохімічного визначення локалізації ДАТ, ДЗ-ДР в слизовій оболонці товстої кишки щурів з експериментальним колітом були використані занурені у парафін фрагменти кишки чи біопсійного матеріалу товщиною 5 мкм. Фрагменти були депарафінізовані, гідратовані, заблоковані

за допомогою 3% $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ та оброблені антиген-вивільнюючим розчином Dako (pH 10.0). Після чого зразки інкубувалися впродовж 12 год при 4°C з первинними кролячими анти-ДЗ-ДР та анти-ДАТ антитілами (1:100), з подальшим біотинілюванням вторинними антитілами та маркуванням стрептавідин-біотин пероксидазою [129].

Для імуногістохімічного визначення локалізації ТН, ДАТ, Д2-ДР та Д3-ДР в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом застосовували антитіла проти ТН, ДАТ, D3R12-p, D2R13-p (1:50). Далі зразки були пофарбовані і проявлені за допомогою методу АВС детекції та оцінені за допомогою мікроскопу (Nikon, Японія). Для підтвердження специфічності антитіл як контроль застосовували імуноабсорбцію антитіл [130].

2.13. Цитохімічне визначення стану келихоподібних клітин

Для виявлення келихоподібних клітин у слизовій оболонці та підслизовій основі зрізи, отримані з матеріалу, фіксованого у формаліні, забарвлювали гематоксиліном Бемера та еозином. Ці зрізи аналізували під світловим мікроскопом ("Olympus System Microscope Model BX41") при збільшенні у 10 та 40 разів з метою підрахунку площі перерізу келихоподібних клітин. Крім того, вимірювали товщину слизової оболонки товстої кишки. Зрізи товстої кишки, отримані з матеріалу, фіксованого у фіксаторі Карнуа, забарвлювали альціановим синім (ТОВ "БиоВитрум", Росія) з метою виявлення келихоподібних клітин у слизовій оболонці та підслизовій основі товстої кишки щурів.

2.13.1. Цитохімічне визначення стану тучних клітин

Для виявлення тучних клітин у слизовій оболонці та підслизовій основі зрізи товстої кишки щурів, отримані з матеріалу, фіксованого у фіксаторі Карнуа, забарвлювали толуїдиновим синім (ТОВ "БиоВитрум", Росія) згідно інструкції виробника. Кількість гранул в тучних клітинах підраховували на світловому мікроскопі ("Olympus System Microscope Model BX41") при збільшенні 100 разів. У кожній експериментальній групі було проаналізовано щонайменше 100 клітин.

2.14. Активність мієлопероксидази

Активність мієлопероксидази (МПО) вимірювали за реакцією з перекисом водню [131]. Зразки слизової оболонки товстої кишки, отримані під час умертвління, гомогенізували, перетираючи в ступці з рідким азотом до утворення порошку, для попередження розморожування. В ступку до прогомогенізованого зразку додавали 1 мл НТАВ буферу. Переносили 1 мл суміші гомогенату та НТАВ буфера в мікропробірку. Мікропробірки зі зразками проводили через 3 цикли: 1 хв в рідкому азоті, 10 хв на водяній бані при $T=37^{\circ}\text{C}$. Потім зразки сонікували протягом 10 с на ультразвуковому дезінтеграторі при вихідній силі струму – 0,5 А. Після сонікації проби центрифугували впродовж 15 хв (14 000 г \cdot м, $T=4^{\circ}\text{C}$).

Як стандарт використовували розчин МПО (Sigma-Aldrich) в розчині НТАВ в концентраціях, що відповідають активності 0,5 U/мл, 0,25 U/мл, 0,125 U/мл, 0,06 U/мл, 0,03 U/мл, 0,015 U/мл.

В лунки 96-луночної плашки вносили по 50 мкл калібрувальних розчинів різної концентрації. Для аналізу завантажували в лунки по 14 мкл супернатанту з процентрифугованих мікропробірок з досліджуваними зразками. У всі лунки вносили по 200 мкл реакційного буфера (6,1 мл розчину

H₂O₂, 4,1 мл розчину ODHC і 4,4 мл фосфатного буфера (pH=6). Через 5-10 хв міряли оптичну густину при довжині хвилі 450 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів (Bio-Rad, США). Активність МПО розраховували на г тканини, досліджуваного зразку. Дані представляли у вигляді – активність МПО U/г.

2.15. Первинна культура перитонеальних макрофагів

Мононуклеарні фагоцити перитонеального ексудату мишей отримували за методом, описаним Pietrangeli [132]. Після умиртвління мишам в умовах стерильності оголяли область черева, обережно знімаючи шкіру. В черевну порожнину вводили 5 мл охолодженого розчину Хенкса і після масування відсмоктували рідину за допомогою стерильного шприца з товстою голкою в охолоджені пробірки. Отриману суспензію клітин двічі відмивали протягом 10 хв при 1000 об/хв (1500 g) і розводили в поживному середовищі RPMI-1640, доводячи кількість клітин до необхідної концентрації в залежності від задачі експерименту. Виходячи із результатів фарбування розчином трипанового синього, в отриманих суспензіях, як правило, містилось не менше 98% живих клітин.

2.15.1. Культивування перитонеальних макрофагів

Клітини перитонеальних макрофагів інкубували в 12-ти лункових планшетах в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 10%-го ETC (Sigma, США), при 37°C, 5 % CO₂.

2.16. НСТ-тест

Для визначення рівня функціональної активності перитонеальних макрофагів вносили отримані перитонеальні макрофаги у 96-лунковий

планшет. У дослідні проби для визначення спонтанної активності вносили 0,1 мл НСТ, для визначення індукованої активності - 0,1 мл НСТ і 0,02 мл РМА як додатковий стимул при стандартних умовах. У контрольну лунку вносили тільки 0,1 мл буфера.

Клітини інкубували протягом 1-ї години за температури 37°C в CO₂-інкубаторі. Після інкубації планшет центрифугували протягом 10 хв при 1000 об/хв. Надосадову рідину видаляли, а до осаду додавали 0,2 мл метанолу.

Проводили повторне центрифугування за тих самих умов. Після видалення надосадової рідини, в усі лунки додавали 0,1 мл КОН і 0,1 мл ДМСО та вміст проб акуратно піпетували.

Проводили облік результатів спектрофотометричним методом при довжині хвилі $\lambda=540$ нм.

Спонтанну активність перитонельних макрофагів виражали в умовних одиницях. Відсоток стимуляції активності перитонельних макрофагів розраховували за формулою:

$$(C_t - C_p) / C_p \times 100\%, \text{ де}$$

C_p - показник оптичної густини спонтанної проби;

C_t - показник оптичної густини стимульованої проби.

2.17. Внутрішньоклітинне вимірювання активних форм кисню

Рівні АФК були виміряні за допомогою 2',7'-дихлородигідрофлуоресцин дیاцетату (H₂DCFDA, Invitrogen) за описаною раніше методикою [133]. Коротко, гепаринізовані кров'яні клітини були проінкубовані з PBS, що містив 10 мкМ карбокси-H₂DCFDA, протягом 30 хв за температури 37° С для вимірювання продукції АФК периферичними моноцитами та гранулоцитами крові. Еритроцити інкубували в лізис-буфері, потім переносили клітини в полістиренові туби з кришками та аналізували за допомогою проточного цитометра (збудження: 488 нм, випромінення 525 нм).

Лише живі клітини були використані для подальшого аналізу. Результати презентували як середня флуоресценція на клітину.

2.18. Визначення фагоцитарної активності лейкоцитів

Вимірювання фагоцитозу на проточному цитометрі проводили за описаною раніше методикою [133]. Коротко, FITC-мічені інактивовані тепловим шоком *Staphylococcus aureus* Cowan I бактерії (колекція кафедри мікробіології та загальної імунології, ННЦ “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка) у концентрації 1×10^7 клітин/мл були додані до гепаринізованої крові в об’ємі 5 мкл. Всі зразки були проінкубовані протягом 30 хв за температури 37°C . Фагоцитоз зупиняли додаванням холодного стоп-реагенту (PBS з 0,02% EDTA та 0,04% параформальдегід). Далі еритроцити інкубували в лізис-буфері. Флуоресценція фагоцитів з поглиненими бактеріями була детектована методом проточної цитометрії. Результати були представлені як процент клітин, що флуоресциують після визначеного періоду культивування (процент фагоцитозу), а також як індекс фагоцитозу, що репрезентує середню флуоресценцію у перерахунку на одну фагоцитуючу клітину (поглинені однією клітиною бактерії).

2.19. Визначення профілю лейкоцитів методом проточної цитометрії

Антитіла проти CD69, кон’юговані з фікоеритрином, та антитіла проти CD14, мічені FITC були використані для визначення числа (процентного вмісту) CD69+ та CD14+ клітин (моноцитів та гранулоцитів) та інтенсивності

поверхневої експресії CD69 та CD14 (середньої флуоресценції на клітину) циркулюючих фагоцитів. Вторинні антитіла (5 мкл) додавали до зразків з гепаринізованою кров'ю (50 мкл) після лізису еритроцитів. Клітини інкубували протягом 25 хв за кімнатної температури. Зразку аналізували за допомогою проточного цитометру FACS Calibur (BD Biosciences, SanJose, CA, USA). Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення CELLQuest (BD: Franklin Lakes, NJ, USA).

2.20. Схеми фармакологічних експериментів

Для дослідження ролі різних типів ДР у розвитку коліту, було використано такі їх агоністи: 1) (-)-квінпірол гідрохлорид - агоніст Д2-ДР (Sigma, USA; 1 мг/100 г); 2) агоніст Д2-ДР - каберголін (Pfizer, USA; 1мкг/100 г та 5 мкг/100 г). Обидва агоністи проникають через гематоенцефалічний бар'єр та здатні впливати на центральні та периферичні Д2-ДР. Обидва компоненти були розчинені в 0,9% фізіологічному розчині перед використанням. Для відокремлення ролі периферичних Д2-ДР у ефектах дофаміну на механізми розвитку ВК був використаний антагоніст Д2-ДР, який майже не проникає через гематоенцефалічний бар'єр – домперідон (Домрид, “Кусум Фарм”; 2 мг/100 г тварини, перорально за 90 хв до аутопсії). 3) агоніст Д3-ДР – (±)-7-гідрокси-N,N-ді-н-пропіл-2- амінотетралін (7-OH-DPAT) (0,02 чи 0,1 мг/100 г, Sigma, USA). 7-OH-DPAT – це синтетичний компонент, який має високу афінність до Д3-ДР.

2.20.1. Дослідження особливостей перебігу йодоацетамід-індукованого коліту у тварин з хімічно-зруйнованими периферичними дофамінергічними нейронами

Щурів масою 140-160 г за тиждень до початку експерименту відсажували в окремі клітки для адаптування та вирівнювання рівня катехоламінів у крові. За 3 дні до початку експерименту тварин переносили в чисті клітки для запобігання стресорних впливів напередодні експерименту. Тварини були розподілені на 4 групи. Першій групі дослідних тварин вводили на I-й день - фізіологічний розчин, 0,1 мл/щур, підшкірно Х4 рази, кожні 2 год та на VII-й день - МЦ 0,1 мл/щур, ректально, 1 день. Другій групі дослідних тварин вводили на I-й день - фізіологічний розчин, 0,1 мл/щур, підшкірно Х4 рази, кожні 2 год та на VII – й день: 6% ЙА, ректально, 1 день. Третій групі тварин на I-й день вводили МРТР 20 мг/кг, підшкірно Х4 рази, кожні 2 години та на VII-й день - МЦ 0,1 мл/щур, ректально х1, 1 день. Четвертій групі тварин на I-й день вводили МРТР 20 мг/кг, підшкірно Х4 рази, кожні 2 години, на VII-й день: 6% ЙА ректально, 1 день. Тварин виводили з експерименту на 18-й день експерименту.

Протягом всього експерименту йшла оцінка клінічних проявів показників ВК. Після умертвління проводили оцінку макроскопічних змін слизової оболонки товстої кишки, викликаних ЙА. Відбирався матеріал для молекулярно-біохімічних досліджень.

2.20.2. Дослідження ролі периферичних D₂-дофамінових рецепторів на зміни ендотеліальної проникності товстої кишки щурів на фоні розвитку експериментального йодоацетамід-викликаного виразкового коліту

Тварин було поділено на 5 груп (n=3): 1) групі I вводили фізіологічний розчин за 75 хвилин до виведення із експерименту та 1% МЦ у дозі 0,1 мл щур (ректально) за 60 хв до умертвління; 2) групі II вводили фізіологічний розчин за 75 хвилин до виведення з експерименту і після чого вводили 6% ЙА ректально за 60 хв до виведення з експерименту; 3) тваринам групи III вводили домперідон у дозі 2 мг/100 г маси тіла (перорально) за 90 хв, фізіологічний розчин (0,1 мл/щур) за 75 хв та 6% ЙА (ректально) за 60 хв до виведення з експерименту. Тваринам IV групи вводили фізіологічний розчин у дозі 0,1 мл/кг (перорально) за 90 хв та квінпірол у дозі 10 мг/кг перорально за 75 хв та 6% ЙА за 60 хв до виведення з експерименту. Тваринам V групи вводили домперідон у дозі 2 мг/100 г (перорально) за 90 хв, квінпірол у дозі 1 мг/100 г (перорально) за 75 хв та 6% ЙА (ректально) до виведення з експерименту.

Тварин анестезували уретаном у дозі 110 мг/100 г маси тіла за півгодини до умертвління, після чого вводили фарбу Еванса у дозі 0,4 мг/100 г тварини (внутрішньовенно) за 15 хв до умертвління. При умертвлінні було видалено 7 см товстої кишки, зішкрябано слизову оболонку та занурено в формамід (4 мл). Після цього зразки були проінкубовані протягом 24 годин при температурі 50С на рухомій водяній бані. Оптичну густину проби вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 620 нм проти формаміду.

2.20.3. Дослідження ефекту активації D2-дофамінових рецепторів каберголіном на показники розвитку експериментального йодоацетамід-викликаного коліту у щурів

Каберголін – це синтетичний ерголін, доза для якого була підібрана згідно результатам, отриманим на моделі гіперстимуляції яєчників щурів. Було показано, що каберголін в дозі 1 мкг/100 г не впливав на ендотеліальну проникність, в той час, як речовина в дозі 5 мкг/100 г незначно знижувала VEGF-опосередковану ендотеліальну проникність без впливу на ангиогенез.

Тварин поділили на дві групи. Дослідним тваринам обох груп вводили 6% ЙА на 1-й день експерименту. На 2-й та 5-й дні експерименту I-й групі вводили фізіологічний розчин, II-й групі вводили каберголін у дозі 1 мкг/100 г маси тіла або 5 мкг/100 г маси тіла. Тварин виводили з експерименту на 7-й день експерименту. Проводили клінічну, макроскопічну та мікроскопічну оцінку ознак ВК.

2.20.4. Дослідження ефекту активації D2-дофамінових рецепторів квінпіролом на показники розвитку йодоацетамід-індукованого коліту у щурів

Квінпірол – агоніст D2-ДР, що може проходити крізь гематоенцефалічний бар'єр та активувати центральні та периферичні дофамінергічні нейрони.

Тварин поділили на дві групи. Дослідним тваринам обох груп вводили 6% ЙА на 1-й день експерименту. На з 2-го по 5-тий день експерименту, щоденно, I-й групі вводили фізіологічний розчин (0,8 мл/щур), перорально, II-й групі вводили квінпірол у дозі 1 мг/100 г маси тіла, перорально. Тварин

виводили з експерименту на 7-й день експерименту. Проводили клінічну, макроскопічну та мікроскопічну оцінку ознак коліту.

2.20.5. Дослідження ефекту активації ДЗ-дофамінових рецепторів 7-ОН-ДРАТ на показники розвитку йодоацетамід-індукованого коліту у щурів

7-ОН-ДРАТ – агоніст ДЗ-ДР, що може проходити крізь гематоенцефалічний бар'єр та діє у ЦНС та на периферії. Тварин поділили на дві групи. Дослідним тваринам обох груп вводили 6% ЙА на 1-й день експерименту. На з 2-го по 5-тий день експерименту, щоденно, I-й групі вводили фізіологічний розчин (0,8 мл/щур), підшкірно, II-й групі вводили 7-ОН-ДРАТ у дозі 0,02/100 г маси тіла або 0,1 мг/100 г маси тіла, підшкірно. Тварин виводили з експерименту на 7-й день експерименту. Проводили клінічну, макроскопічну та мікроскопічну оцінку ознак ВК.

2.21. Статистичний аналіз отриманих результатів

Статистичний аналіз даних проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для порівняння вибірок підраховували середнє арифметичне та похибку середнього арифметичного. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3

СТАН ПЕРИФЕРИЧНОЇ ДОФАМІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ В
ПАТОГЕНЕЗІ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ3.1. Рівень тирозинової гідроксилази в слизовій оболонці товстої
кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого коліту

За розвитку експериментального ВК у щурів спостерігається достовірне підвищення рівня ТН через 0,5 год (в 1,4 рази, $p < 0,05$) з подальшим зниженням рівня ТН на 2 (в 1,8 разів, $p < 0,05$), 6 год (в 1,8 разів, $p < 0,05$) та 7 (в 2 рази, $p < 0,05$) і 14 (в 3,3 разів, $p < 0,05$) днів після введення ЙА (рис. 3.1).

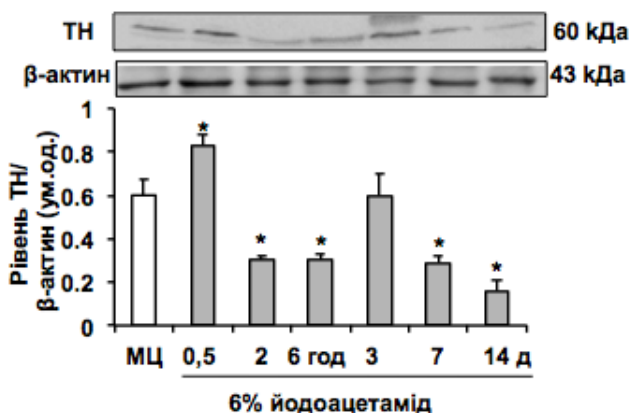


Рис. 3.1. Рівень тирозинової гідроксилази (ТН) в слизовій оболонці товстої кишки щурів в контролі та через 0,5, 2, 6 год, 7 і 14 днів після моделювання експериментального коліту шляхом інтравектального введення 6% ЙА. Вестерн блот, $M \pm SD$, $n=21$. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем (МЦ).

Зниження рівня ТН, ензиму, що лімітує синтез дофаміну з амінокислоти тирозин, свідчить про зниження рівня синтезу дофамінергічних нейронів у товстій кишці за розвитку ВК. При цьому, згідно отриманих даних, описані зміни мають динаміку прогресування у часі.

3.2. Рівень та локалізація дофамінового транспортеру в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого виразкового коліту

Нами встановлено, що за нормальних умов ДАТ локалізований по всій поверхні крипт епітеліоцитів, на ендотеліоцитах, а також на ентеральних нейронах слизової оболонки товстої кишки щурів (рис. 3.2, А). За умов запалення при ЙА-індукованому ВК спостерігалася зміна локалізації ДАТ до апікальної частини епітелію товстої кишки (рис. 3.2, Б).

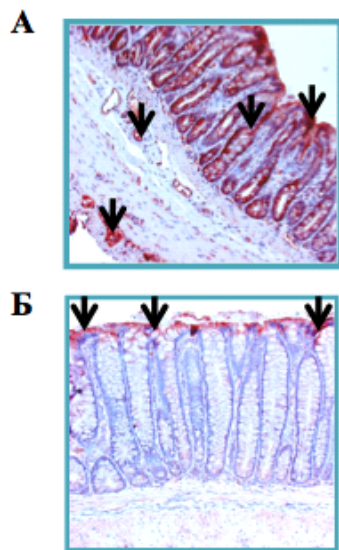


Рис. 3.2. Локалізація ДАТ (червоний колір) в слизовій оболонці товстої кишки щурів в нормі (А) та при йодоацетамід-індукованому коліті (Б). (Імуногістохімія, Х40, стрілками вказана локалізація), n=21.

Зниження рівня ДАТ було підтверджено даними Вестерн блот аналізу (рис. 3.3). За розвитку експериментального ВК спостерігалось вірогідне зниження рівня ДАТ через 2 (в 1,2 рази, $p < 0.05$), 6 годин (в 1,3 рази, $p < 0.05$) та 7 днів (в 1,3 рази, $p < 0.05$). За хронічної стадії ВК (14 днів) спостерігалось зниження рівня ДАТ в 1,3 рази ($p < 0.05$).

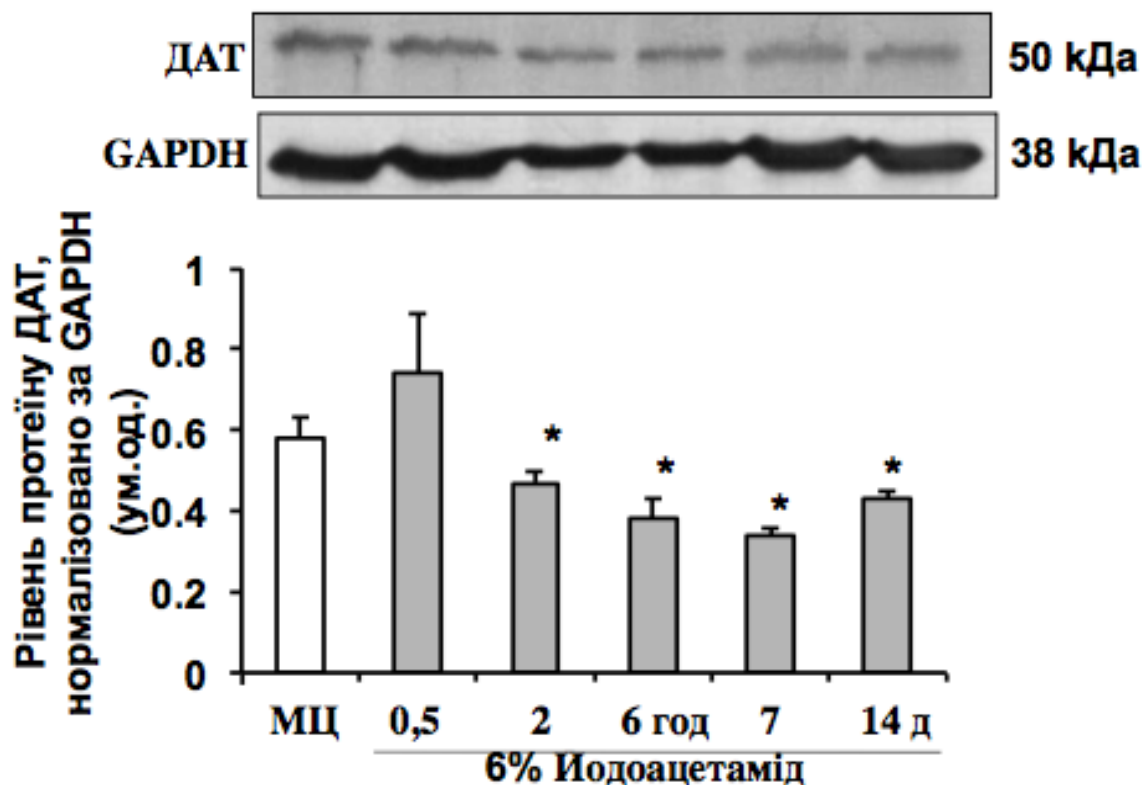


Рис. 3.3. Рівень ДАТ в слизовій оболонці товстої кишки щурів в контролі та через 0,5, 2, 6 год, 7 і 14 днів після моделювання коліту 6% йодоацетамідом. $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем (МЦ).

ДАТ відповідає за зворотнє захоплення дофаміну з синаптичної щілини, який надалі акумулюється нервовими клітинами [134]. Крім того, було встановлено, що мікробіота здатна синтезувати дофамін [10], відповідно,

локалізація ДАТ на епітеліоцитах є необхідною для зворотнього захоплення внутрішньопросвітнього дофаміну.

Таким чином, зниження рівня ДАТ при експериментальному ВК може вказувати на порушення захоплення дофаміну. Зміна локалізації на переважно апікальну вказує на можливу захисну роль ДАТ за розвитку експериментального ВК.

3.3. Рівень моноамінооксидази-Б в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого виразкового коліту

МАО-Б є ферментом, що каталізує розпад катехоламінів, у тому числі й дофаміну. Згідно з літературними даними, на ранніх етапах хвороби Паркінсона спостерігається підвищення рівня МАО-Б, що, в свою чергу, сприяє зниженню рівня дофаміну. Згідно з результатами нашого дослідження рівень МАО-Б достовірно підвищувався у 1,3 рази ($p < 0,05$) через 0,5 год після введення ЙА, але майже у 2 рази ($p < 0,05$) знижувався через 2 год після введення ЙА. Також спостерігалось поступове достовірне зниження рівня МАО-Б у часі (рис. 3.4).

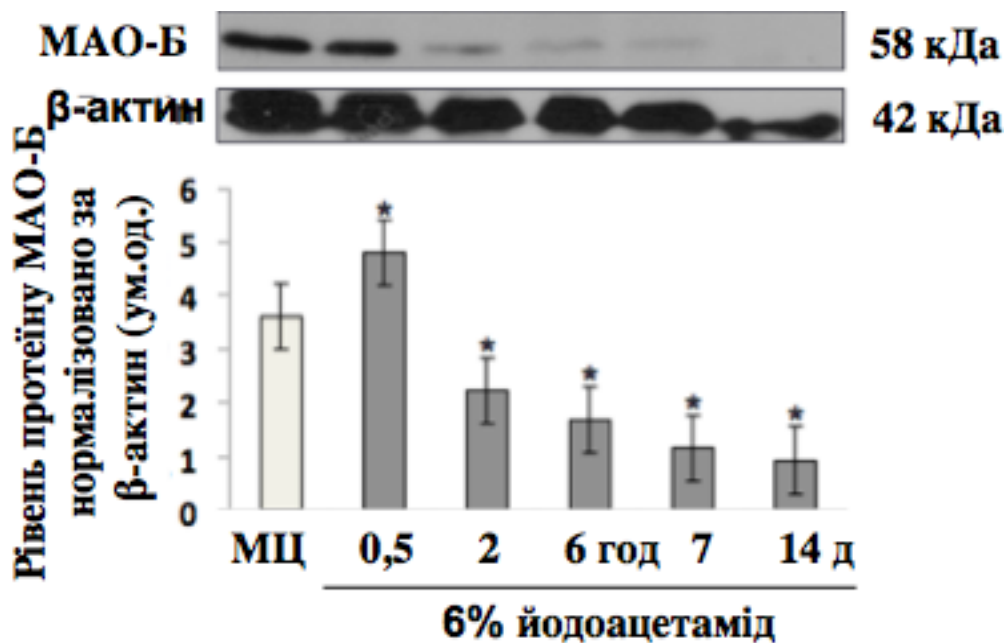


Рис. 3.4. Рівень MAO-B в слизовій оболонці товстої кишки щурів в контролі та через 0,5, 2, 6 год, 3 та 7 днів після моделювання експериментального коліту 6% ЙА. Вестерн блот, $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем (МЦ).

Отримані дані можна пояснити тим, що рівень MAO-B знаходиться в прямій залежності від кількості продукту, що синтезується TH. На сьогоднішній день даних щодо зміни MAO-B за розвитку експериментального ВК немає, але відомо, що MAO-B розщеплює дофамін чорної субстанції, який є дефіцитним за хвороби Паркінсона, перетворюючи його на перекис водню та токсичні альдегідні метаболіти дофаміну. Тому, інгібітори MAO-B, такі, як селегілін та разагілін, є ефективними для лікування хвороби Паркінсона [Nagatsu, Sawada, 2006].

3.4. Рівень D2-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого виразкового коліту

Свою дію дофамін опосередковує через 5 типів ДР, які можуть бути згруповані у 2 родини: D1-подібні (D1, D5) та D2-подібні (D2, D3, D4) [135]. Транскрипти до D1-, D2-, D3- та D5- ДР були знайдені по всій довжині ШКТ, серед яких найбільш розповсюдженими були D2- та D3-ДР [39].

Експресія D2-ДР була виявлена на ендотеліальних [39; 136] та клітинах-попередниках ендотеліальних клітин [137] переважно у дистальному відділі товстої кишки [138]. Дані щодо рівня експресії D2-ДР за умов запалення в товстій кишці, відсутні.

За розвитку експериментального ВК у щурів рівень D2-ДР підвищувався у 2,9 ($p < 0,001$) та 2,8 рази ($p < 0,001$), відповідно, через 2, 6 год, 7 та 14 днів у 2,5 ($p < 0,001$) та 3 рази ($p < 0,001$), відповідно (рис. 3.5).

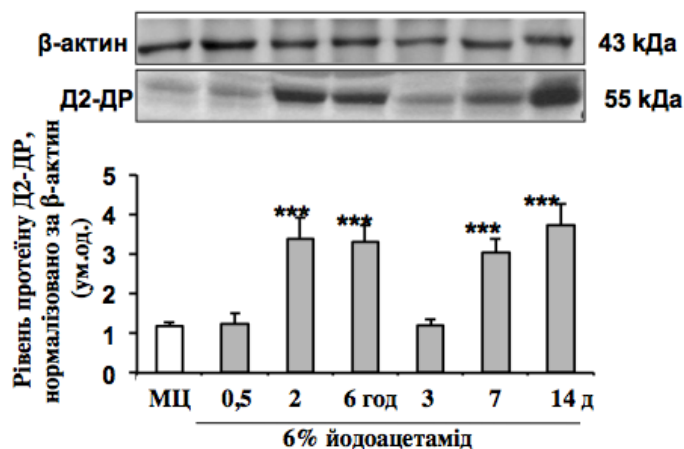


Рис. 3.5. Рівень D2-ДР в слизовій оболонці товстої кишки щурів в контролі та через 0,5, 2, 6 год, 7 і 14 днів після моделювання експериментального коліту 6% ЙА. Вестерн блот, $M \pm SD$, $n=21$. *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем (МС).

Збільшення рівня D2-ДР може бути пов'язаним з компенсаторною реакцією на знижений локальний дофамінергічний тон і може вказувати на важливість D2-ДР у регуляції метаболізму дофаміну. В дослідженнях на моделі D2-ДР нокаутованих мишей встановлено зворотній взаємозв'язок між рівнем протеїну D2-ДР та рівнями протеїнів TH і DAT, що є характерним саме для даного типу рецептора, і не спостерігалось на моделі D3-ДР нокаутованих мишей [163]. Відповідно, отримані нами дані свідчать про патологічні зміни дофамінергічного сигналіngu в товстій кишці щурів за експериментального ВК.

3.5. Рівень та локалізація D3-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни йодоацетамід-індукованого виразкового коліту

Відомо, що D3-ДР також належать до D2-підкласу, що є інгібіторами аденілатциклази.

За результатами проведеного нами імуногістохімічного дослідження було встановлено, що локалізація D3-ДР відрізняється в нормі та на різних стадіях перебігу запалення при ЙА-індукованому експериментальному ВК (рис. 3.6). У контрольній групі імунопозитивні на D3-ДР були ендотеліальні та епітеліальні клітини, а також ентеральні нейрони товстої кишки. Спостерігалася переважно епітеліальна локалізація D3-ДР, причому, вони рівномірно розміщувалися по всій поверхні крипт (з основи до верхівки) на апікальних та базолатеральних мембранах епітеліоцитів та келихоподібних клітин. У той час, як на фоні 7 діб після введення ЙА спостерігалось помітне збільшення експресії D3-ДР в м'язовій частині слизової оболонки товстої кишки та їх локалізація зсунулася ближче до верхівки крипт на апікальну мембрану епітеліоцитів, а експресія D3-ДР на келихоподібних клітинах

помітно зменшилася. При цьому майже не ідентифікувалися імунопозитивно-забарвлені ендотеліоцити та нейрони.

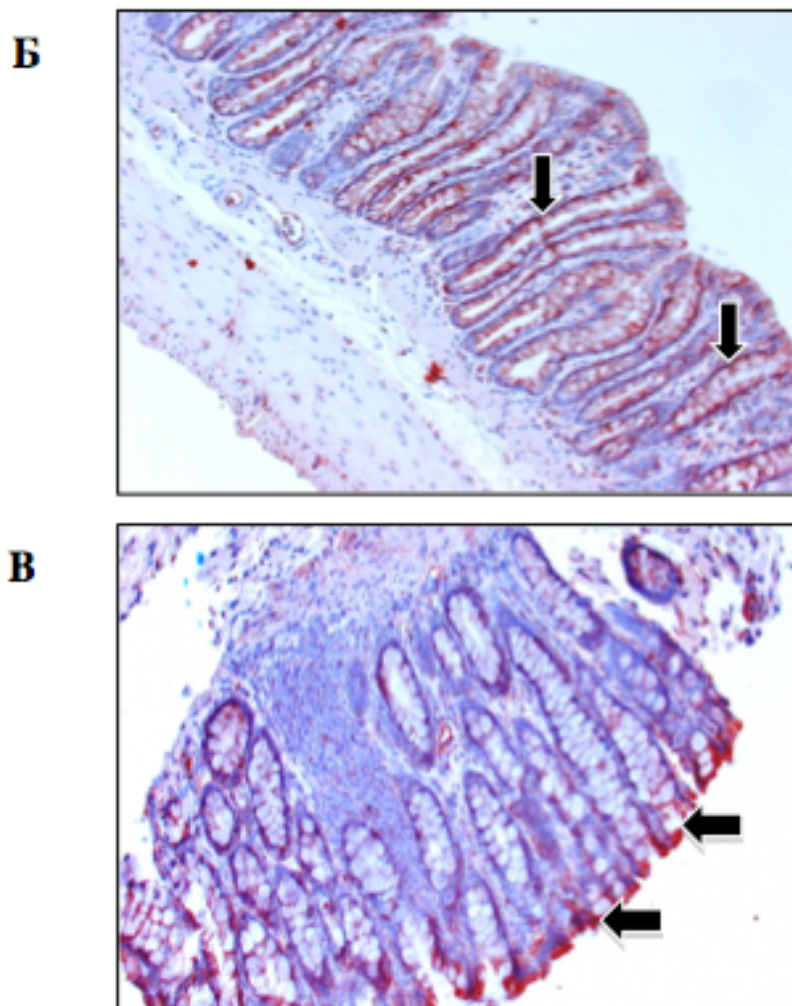


Рис. 3.6. Локалізація Д3-ДР (червоний колір) в товстій кишці щурів в нормі (А) та при ЙА-індукованому коліті (Б) (Імуногістохімія, Х40, стрілками вказана локалізація). n=21.

Далі ми перевірили зміну рівня протеїну Д3-ДР в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни розвитку ЙА-індукованого ВК методом Вестерн блот аналізу. Як видно з рисунку 3.7, рівень Д3-ДР зменшувався у 1,6 рази ($p < 0.05$) вже через 2 год після введення ЙА, достовірно знижувався через

6 год у 1,7 рази ($p < 0,05$), через 3 дні у 1,3 рази ($p < 0,05$), 7 та 14 днів, але так і не досягав контрольних значень.

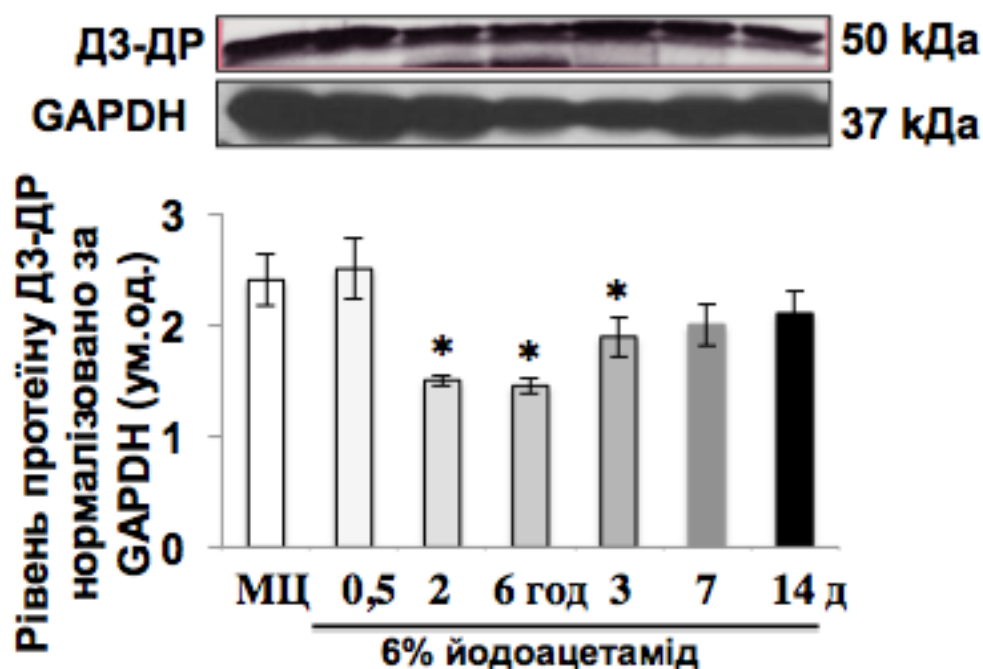


Рис. 3.7. Рівень Д3-ДР в слизовій оболонці товстої кишки щурів в контролі та через 0,5, 2, 6 год, 7 і 14 днів після моделювання експериментального коліту введенням 6% ЙА. Вестерн блот, $M \pm SD$, $n=21$. *** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем (МЦ).

За літературними даними, гени, що кодують Д3-ДР (як і інші рецептори даної групи, окрім Д4) виявлені по всій довжині травного тракту, починаючи від шлунка, закінчуючи товстою кишкою. При цьому, транскрипти до Д3-ДР знайдені в слизовій оболонці і в нервово-м'язовому плетиві [33]. Це підтверджує те, що дофамін може опосередковувати свою дію через Д3-ДР у ШКТ. Але яку саме роль відіграє даний тип рецептора, залишається невідомим. Зміна локалізації Д3-ДР на переважно епітеліальну на поверхні

крипт на фоні розвитку запалення за умов ЙА-викликаного ВК, вказує на можливу захисну роль даних рецепторів. У будь-якому разі, дана гіпотеза потребує подальших досліджень та експериментального доведення.

3.6. Стан периферичної дофамінергічної системи у пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом

Для визначення стану периферичної дофамінергічної системи у пацієнтів з неспецифічним ВК були визначені рівні ТН, ДАТ, Д2-ДР та Д3-ДР. Як вже було зазначено вище, дані показники відображають стан дофамінергічної системи та порушення їх рівнів часто асоційоване з патологічними станами.

3.6.1. Імуногістохімічна ідентифікація тирозинової гідроксилази в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом

У здоровій СОТК спостерігався значний рівень ТН на апікальній мембрані колоноцитів та базальній мембрані келихоподібних клітин (Рис. 3.8).

Запалена СОТК пацієнтів з неспецифічним ВК характеризувалася зниженням рівнів ТН 1,8 разів, в основному на колоноцитах.



Рис. 3.8. Локалізація тирозинової гідроксилази (ТН) (коричневий колір) в товстій кишці пацієнтів в нормі та з неспецифічним виразковим колітом (Імуногістохімія, X10).

Зниження рівню ТН вказує на порушення синтезу дофаміну, а, отже, і рівню дофаміну за неспецифічного ВК у пацієнтів.

3.6.2 Імуногістохімічна ідентифікація дофамінового транспортеру в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом

У здоровій СОТК спостерігався значний рівень ДАТ, на апікальній мембрані колоноцитів та базальній мембрані келихоподібних клітин. При цьому рівні та локалізація ДАТ достовірно не відрізнялася в нормі та патології (Рис. 3.9) .

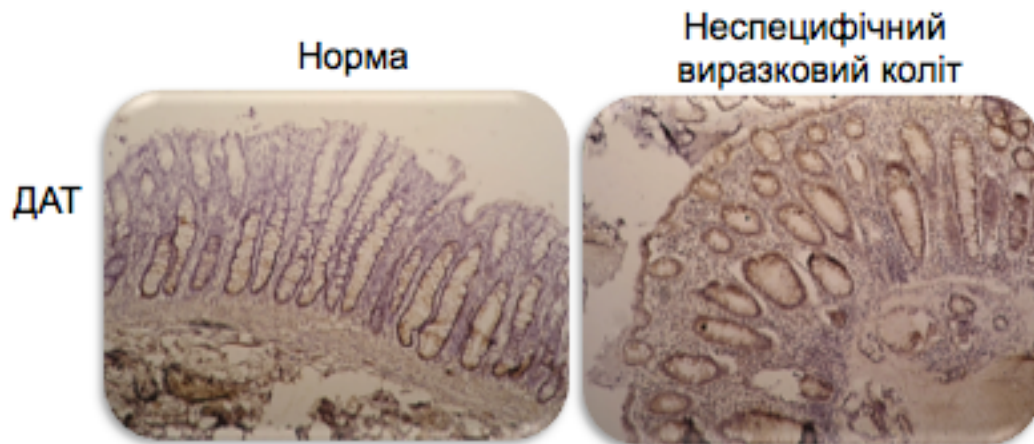


Рис. 3.9. Локалізація тирозинової гідроксилази (ТН) та дофамінового транспортеру (ДАТ) (коричневий колір) в товстій кишці пацієнтів в нормі та з неспецифічним виразковим колітом (Імуногістохімія, X10).

Можливо, дофаміновий сигналінг у пацієнтів з неспецифічним ВК порушувався на тлі підвищення дофамін-деградуючих ензимів таких, як МАО та катехол-О-метилтрансфераза. Проте, дана гіпотеза не вивчалася і потребує подальшого експериментального доведення.

3.6.3. Імуногістохімічна ідентифікація D₂-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом

У здоровій СОТК спостерігався значний рівень D₂-ДР на апікальній мембрані колоноцитів та базальній мембрані келихоподібних клітин (Рис. 3.10).

Також спостерігалось зниження рівня D₂-ДР у 1,3 рази у запаленій СОТК пацієнтів з неспецифічним ВК.

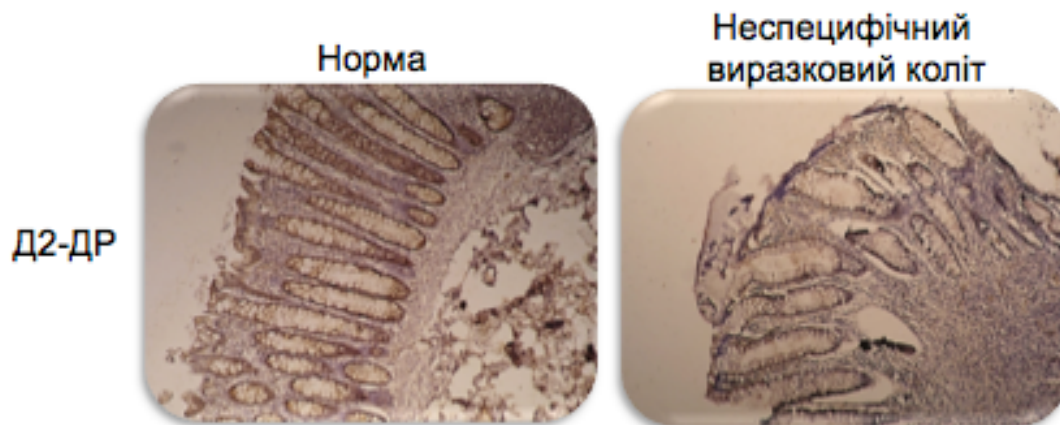


Рис. 3.10. Локалізація D2-ДР (коричневий колір) в товстій кишці пацієнтів в нормі та з неспецифічним виразковим колітом (Імуногістохімія, X10).

Зниження рівня D2-ДР також вказує на порушення дофамінового сигналіngu у пацієнтів з неспецифічним ВК. Отримані дані корелюють з даними по локалізації D2-ДР, отриманими на моделі експериментального ВК у щурів за гострої форми експериментального ВК (3 дні) (Рис. 3.5).

3.6.4. Імуногістохімічна ідентифікація D3-дофамінових рецепторів в слизовій оболонці товстої кишки пацієнтів з неспецифічним виразковим колітом

У здоровій СОТК спостерігався значний рівень D3-ДР на апікальній мембрані колоноцитів та базальній мембрані келихоподібних клітин (Рис. 3.11). Спостерігалось зниження рівня D3-ДР у 1,3 рази у запаленій СОТК пацієнтів з неспецифічним ВК.

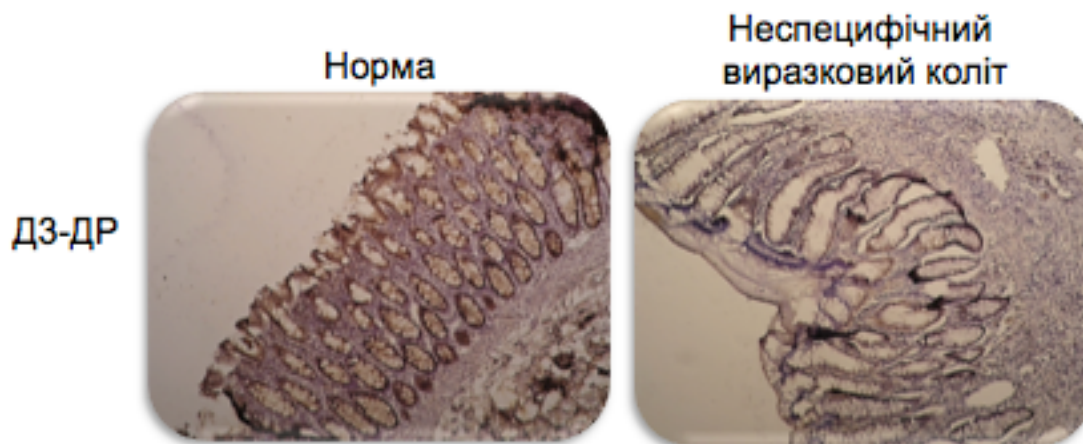


Рис. 3.11. Локалізація ДЗ-ДР (коричневий колір) в товстій кишці пацієнтів в нормі та з неспецифічним виразковим колітом (Імуногістохімія, Х10).

Зниження рівня Д2-ДР та ДЗ-ДР підтверджує порушення дофамінового сигналіngu у пацієнтів з неспецифічним ВК.

Отримані зміни стану периферичної дофамінергічної системи підтверджують релевантність наших даних, отриманих на моделі експериментального ВК у щурів. Також ці зміни можуть мати прямий взаємозв'язок з рецидивами хвороби у хворих на неспецифічний ВК, тому пошук нових мішеней для терапії ВК з застосування агоністів Д2-ДР і Д3-ДР є необхідним і перспективним напрямком досліджень.

Висновки до розділу:

1. За ЙА-індукованого ВК спостерігається зниження рівня ТН в СОТК щурів, що свідчить про зниження рівня дофаміну.

2. Встановлено, що за нормальних умов ДАТ локалізується на епітеліоцитах, ендотеліоцитах та ентеральних нейронах слизової оболонки

товстої кишки щурів. За ЙА-індукованого ВК спостерігається зниження рівня ДАТ, що вказує на порушення захоплення внутрішньопросвітного дофаміну .

3. За ЙА-індукованого ВК спостерігається зниження рівня MAO-B в СОТК щурів, що може корелювати зі зниженням рівня дофаміну в товстій кишці щурів.

4. Встановлено збільшення рівня Д2-ДР в СОТК щурів за умов ЙА-індукованого ВК.

5. Вперше показано, що локалізація Д3-ДР відрізняється в нормі та за ЙА-індукованого ВК. В нормі Д3-ДР знайдені на ендо- та епітеліальних клітинах та ентеральних нейронах товстої кишки. За розвитку запалення слизової оболонки товстої кишки щурів при ЙА-індукованому ВК спостерігається зниження рівня Д3-ДР.

6. Отже, нами встановлено зміни локалізації TH, ДАТ, Д2- та Д3-ДР у пацієнтів з неспецифічним ВК.

7. Рецидиви хронічного ВК асоційовані з зниженням синтезу дофаміну, а також рівнів Д2- та Д3- ДР СОТК.

РОЗДІЛ 4

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ, ОПОСЕРЕДКОВАНІ АКТИВАЦІЄЮ Д2-ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ

4.1. Макро- та мікроскопічні показники перебігу експериментального коліту у щурів за введення агоністів Д2-дофамінових рецепторів квінпіролу та каберголіну

Для дослідження ролі Д2-ДР в механізмах гоєння уражень товстої кишки при експериментальному ВК було застосовано два агоністи Д2-ДР – квінпірол та каберголін.

Квінпірол – агоніст центральних та периферичних Д2-ДР. За активації Д2-ДР шляхом введення квінпіролу (1 мг/100 г, п/о) спостерігалось достовірне покращення клінічних показників перебігу ВК, зокрема летаргії, діареї та зменшення втрати маси тіла. При аутопсії визначали макроскопічні показники ураження. Встановлено, що активація Д2-ДР зумовлювала достовірне зниження таких макроскопічних показників перебігу ВК, як: розмір уражень (в 2,6 рази, $p < 0.001$), потовщення (в 1,2 рази, $p < 0.05$), маса вологої кишки (в 1,2 рази, $p < 0.05$) та товщина стінки товстої кишки (1-3 бали) (в 2,1 рази, $p < 0.001$) в групі тварин, яким вводили квінпірол (рис. 4.1).

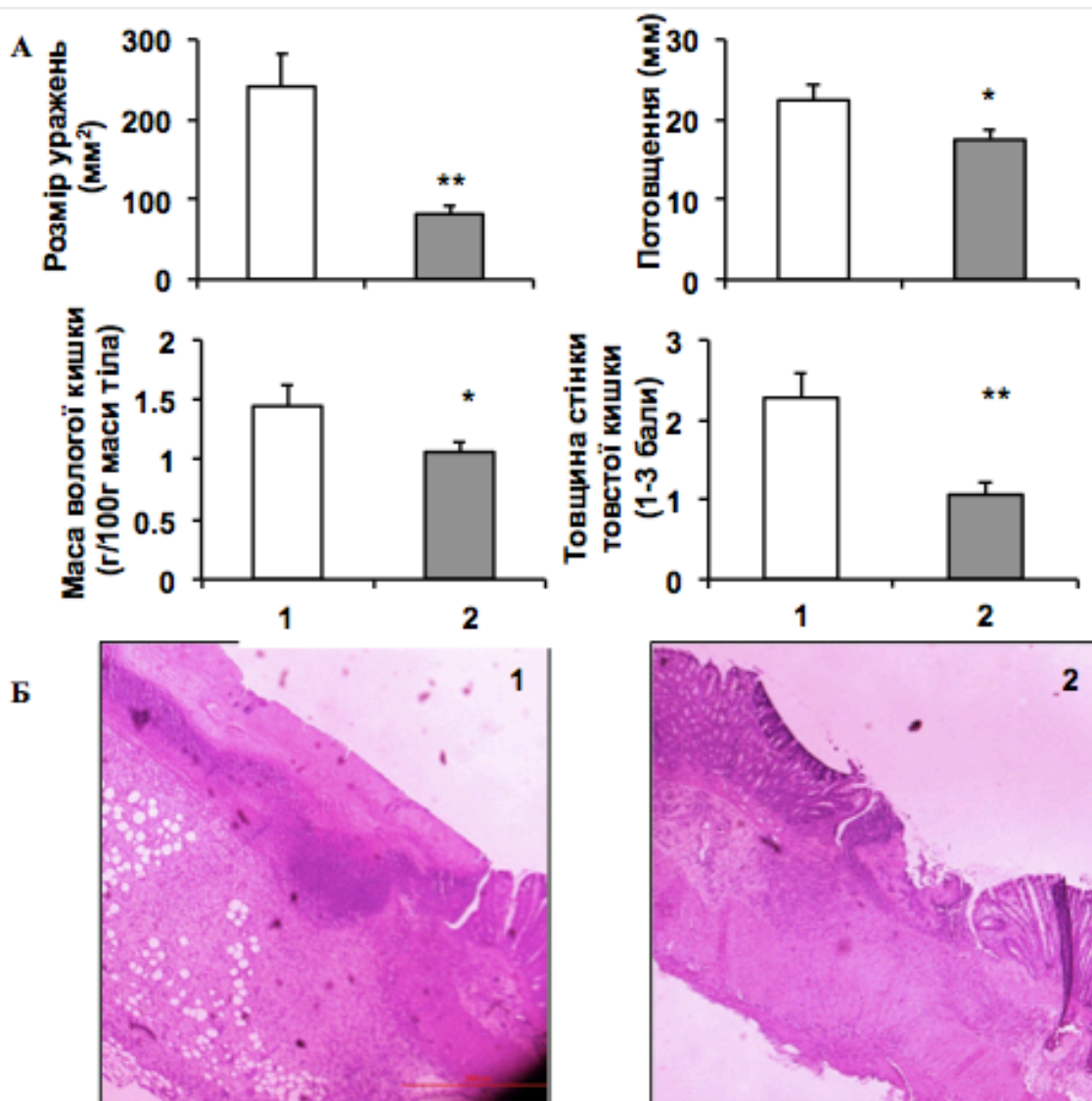


Рис. 4.1. Вплив агоністу Д2-ДР квінпіролу на макроскопічні (А) та макроскопічні (Б) показники ураження товстої кишки щурів з ЙА-викликаним колітом. $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем (МС). Світлова мікроскопія слизової оболонки товстої кишки щурів (Б) (гематоксилін-еозин, Х40). 1 – фізіологічний розчин (0,8 мл, п/о); 2 – квінпірол (1 мг/100 г, п/о).

За результатами мікроскопічного дослідження було показано нормалізацію СОТК та зменшення кількості та розміру ерозій (рис. 4.1, Б).

Отримані дані свідчать про позитивну роль активації Д2-ДР за введення квінпіролу у загоєнні ВК та нормалізації мікро- та макро-скопичних показників експериментального ВК.

Каберголін – комерційно доступний агоніст Д2-ДР. Для визначення впливу каберголіну на загоєння експериментального ВК через активацію Д2-ДР, дві дози каберголіну (1 та 5 мкг/100г маси тіла) були обрані, згідно з літературними джерелами [139]. Спостерігали дозозалежний ефект каберголіну (рис.4.2), а саме: у дозі 1 мкг/100г достовірного зниження макро- та мікро-скопичних показників не спостерігалось. У дозі 5 мкг/100г маси тіла каберголін знижував такі макроскопічні показники ВК, як розмір уражень, потовщення, маса вологої кишки та товщина товстої кишки (1-3 бали) (рис. 4.2, А).

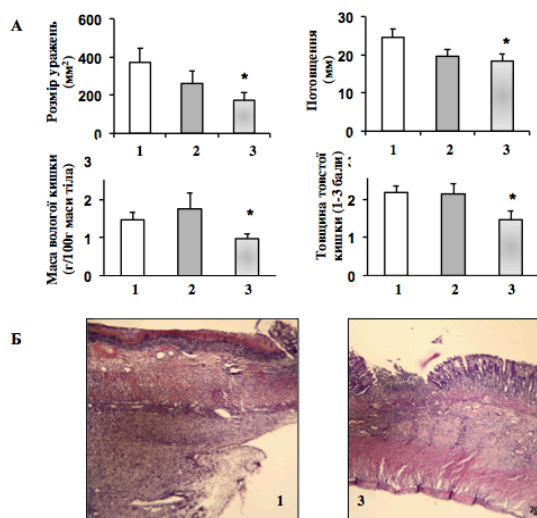


Рис 4.2. Вплив агоністу Д2-ДР каберголіну на макроскопічні (А) показники ураження товстої кишки щурів з йодоацетамід-викликаним колітом. $M \pm SD$, $n=18$. * - $p<0,05$ у порівнянні з контролем (1). Світлова мікроскопія слизової оболонки товстої кишки щурів (Б) (гематоксилін-еозин, Х40). 1 – Фізіологічний розчин; 2 – каберголін (1 мкг/100 г, п/о); 3 – каберголін (5 мкг/ 100 г, п/о).

За результатами мікроскопічного дослідження було показано нормалізацію СОТК та зменшення кількості та розміру ерозій (рис. 4.2, Б) у тварин, яким за умов експериментального ВК вводили каберголін в дозі 5 мкг/100 г. Отримані дані свідчать про позитивну роль активації Д2-ДР за введення каберголіну в дозі 5 мкг/100г маси тіла у загоєнні та нормалізації мікро- та макро-скопичних показників експериментального ВК. Слід зазначити, що саме в такій дозі каберголін пригнічував ендотеліальну проникність на моделі гіперстимуляції яєчників [176], що підтверджує взаємозв'язок між ступенем запалення СОТК при ВК та рівнем ендотеліальної проникності.

4.2. Роль Д2-дофамінових рецепторів в регуляції епітеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов експериментального коліту

Відповідно до сучасної концепції патогенезу ЗЗК, до яких належать ВК та ХК, порушення кишкового бар'єру є ключовим патогенетичним фактором [45]. Підтримання кишкового бар'єру забезпечується інтегративною цілісністю епітеліального та ендотеліального бар'єрів.

Тому, для подальшого дослідження механізму, що лежить в основі позитивних ефектів активації Д2-ДР, були проведені дослідження з ендо- та епі-теліальної проникності СОТК щурів.

Ми перевірили ефект активації Д2-ДР на показники епітеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів, яку визначали за переходом 4,0 кДа FITC-декстрану із просвіту кишки в системний кровотік (рис. 4.3).

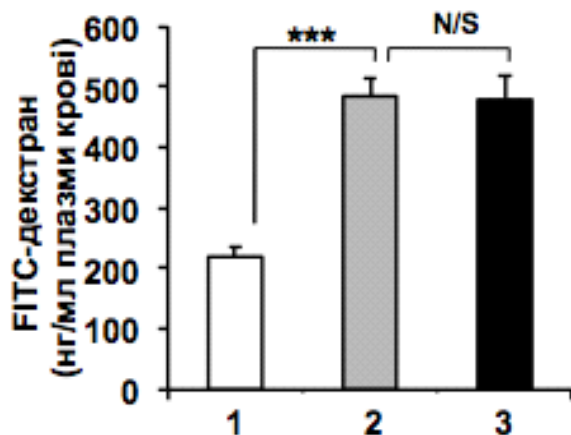


Рис. 4.3. Вплив агоністу D₂-ДР квінпіролу на рівень проникності епітеліального шару слизової оболонки товстої кишки щурів за умов ЙА-викликаного коліту. M±SD, n=18. *** - p<0,001 у порівнянні з контролем (МС). 1 – 1% метилцелюлоза (0,1 мл, і.р.) + фізіологічний розчин. 2 – 6% ЙА (0,1 мл, і.р.) + фізіологічний розчин. 3 – 6% ЙА + квінпірол (1 мг/100 г, п/о).

За умов експериментального ВК, викликаного введенням 6% ЙА спостерігалось підвищення епітеліальної проникності в 2,3 рази (p<0.001) відносно контрольної групи. Введення квінпіролу не викликало достовірних змін епітеліальної проникності за умов експериментального ВК у щурів.

4.3. Роль D₂-дофамінових рецепторів в регуляції ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов експериментального коліту

На тлі експериментального ВК, викликаного введенням 6% ЙА спостерігалось підвищення ендотеліальної проникності в 5,1 разів (p<0.01) відносно контрольної групи. Введення квінпіролу викликало достовірне

зниження ендотеліальної проникності в 1,4 рази ($p < 0.05$), порівняно з групою експериментального ВК (рис. 4.4).

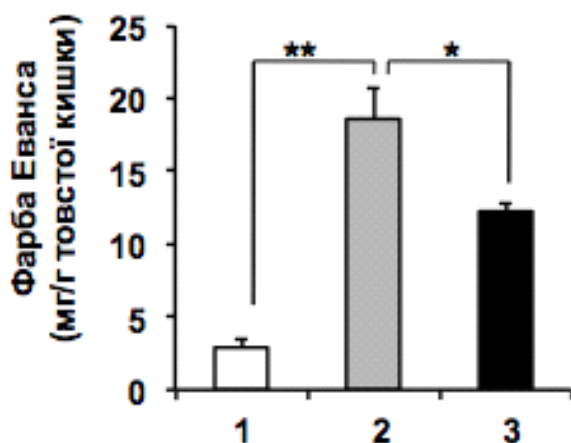


Рис. 4.4. Вплив агоністу D₂-ДР квінпіролу на рівень проникності кровоносних мікросудин ендотеліального шару слизової оболонки товстої кишки щурів за умов ЙА-викликаного коліту. $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ у порівнянні з контролем (МС). 1 – 1% метилцелюлоза (0,1 мл, і.р.) + фізіологічний розчин. 2 – 6% ЙА (0,1 мл, і.р.) + фізіологічний розчин. 3 – 6% ЙА + квінпірол (1 мг/100 г, п/о).

Отже, за введення агоністу D₂-ДР квінпіролу спостерігалось значне зниження рівня ендотеліальної проникності, що свідчить про протективну дію даного рецептору.

4.4. Залучення Src- та Akt- кіназних шляхів до механізмів перебігу експериментального коліту у щурів за умов активації D₂-дофамінових рецепторів

Для з'ясування механізму, за яким агоніст D₂-ДР знижує ендотеліальну проникність, ми перевірили залучення основних сигнальних молекул VEGF-

опосередкованого контролю ендотеліальної проникності - pAkt та p-c-Src у перебігу ЙА-індукованого ВК. Src та Akt є різними типами протеїнкіназ, а саме Src є тирозиною протеїнкіназою, а Akt є серин/треоніною протеїнкіназою [140; 141].

Нами було показано, що за ЙА-індукованого ВК рівень p-c-Src знижувався у 1,7 рази ($p < 0,05$) відносно контролю, тоді, як, Akt фосфорилювання (активованій стан) знижувалося у 2,2 рази ($p < 0,05$) відносно контролю (рис. 4.5, А, Б). При цьому кількість загальних протеїнів c-Src та Akt залишалася незмінною.

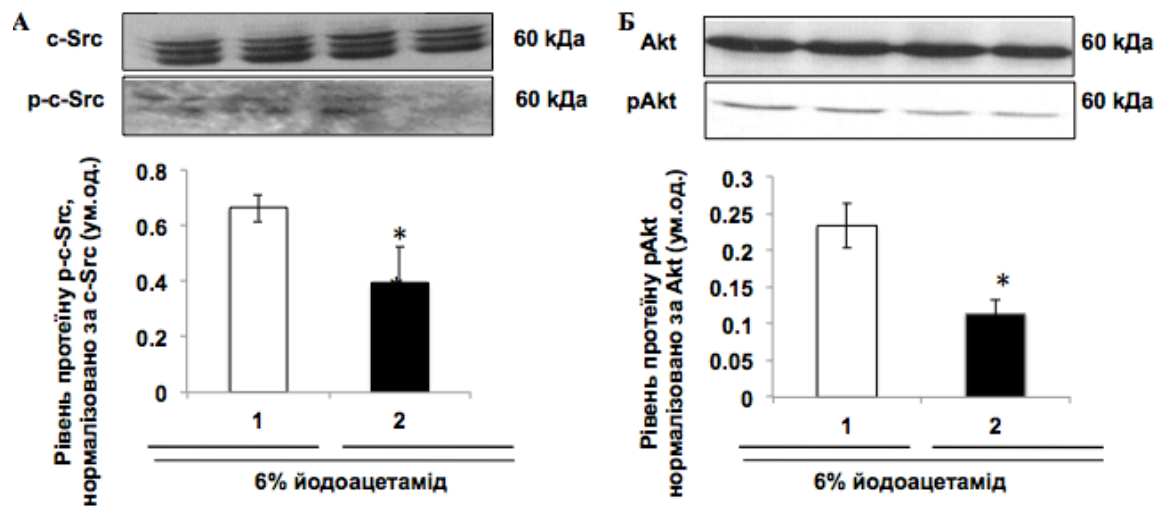


Рис. 4.5. Рівень c-Src (А) та Akt (Б) та їх фосфорильованих форм у слизовій оболонці товстої кишки щурів через за введення фізіологічного розчину (1) або квінпіролу (1 мг/100 г, п/о) (2) на тлі ЙА-індукованого коліту. Вестерн блот аналіз, $M \pm SD$, $n=18$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем (МЦ).

Отже, механізм зниження ендотеліальної проникності, опосередкований введенням квінпіролу, був асоційованим зі зниженням фосфорилювання (активації) Akt та Src сигнальних каскадів.

4.5. Визначення ролі центральних та периферичних D2-дофамінових рецепторів в регуляції ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов експериментального коліту

Квінпірол – агоніст D2-ДР, який проходить через гематоенцефалічний бар'єр і тому впливає на центральні та периферичні дофамінергічні нейрони. Через це, питання про позитивний вплив центральних або периферичних D2-ДР на рівень ендотеліальної проникності СОТК і, відповідно, перебіг експериментального ВК, залишається нерозкритим. Для з'ясування ролі центральних та периферичних D2-ДР в регуляції ендотеліальної проникності ми застосували селективний антагоніст D2-ДР домперідон. Домперідон не проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр і впливає лише на периферичні дофамінергічні рецептори [142]. Домперідон є комерційно доступним антагоністом та широко використовується для лікування гастропарезу, функціональної диспепсії, нудоти та блювоти, а також педіатричного рефлюксу [143-146]. За попереднього введення домперідону ендотеліальна проникність товстої кишки щурів з експериментальним ВК була у 1,2 рази ($p < 0,05$) нижчою у порівнянні з контрольною групою (рис. 4.6). Ці дані можуть свідчити про те, що ендогенна активація периферичних дофамінергічних нейронів може мати негативну роль в патогенезі ЗЗК через підвищення ендотеліальної проникності товстої кишки. У попередніх дослідженнях позитивні ефекти антагоністів D2-ДР були показані на моделях шлункових виразок [160; 202].

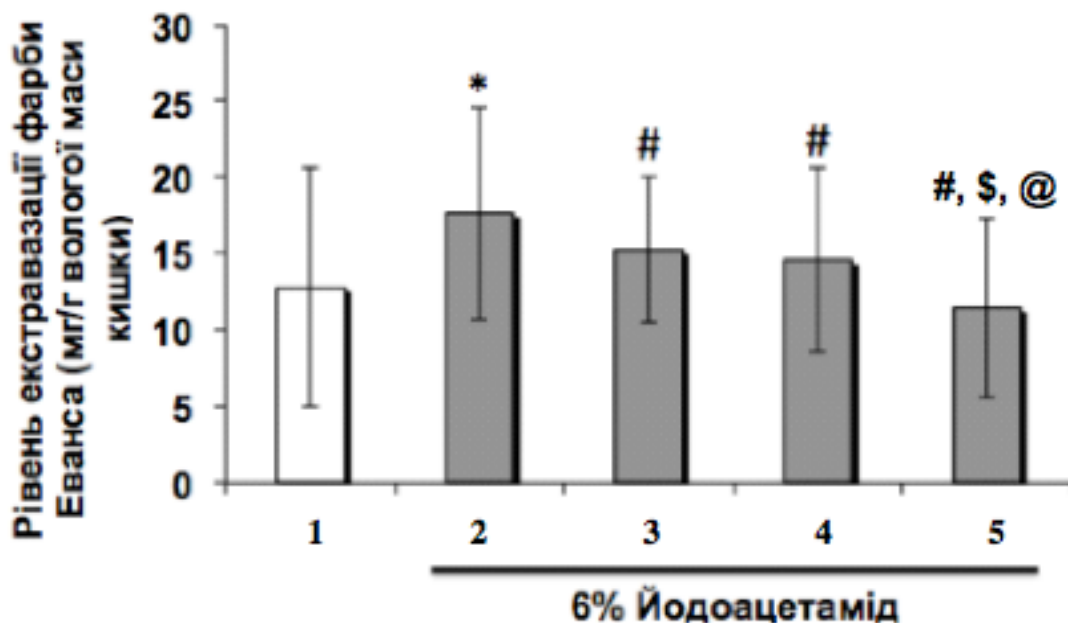


Рис. 4.6. Ефект антагоністу Д2-ДР рецепторів домперідону, агоністу Д2-ДР квінпіролу та їхньої комбінації на ендотеліальну проникність слизової оболонки товстої кишки щурів на тлі ЙА-індукованого коліту. 1 – контроль (МЦ+фізіологічний розчин); 2 – фізіологічний розчин; 3 – домперідон (2 мг/100 г, п/о); 4 – квінпірол (1 мг/100 г, п/о); 5 – домперідон+квінпірол. $M \pm SD$, $n=15$. * – $p < 0.05$, у порівнянні з 1; # - $p < 0.05$, у порівнянні з групою 2. \$ - $p < 0.05$, у порівнянні з групою 3. @ - $p < 0.05$, у порівнянні з групою 4.

За попереднього введення квінпіролу (1 мг/100 г, п/о) спостерігалось пригнічення ендотеліальної проникності у 1,2 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з щурами, яким вводили фізіологічний розчин. Сумісне введення квінпіролу та домперідону призводило до потенціювання ефекту (зниження у 1,5 рази, $p < 0,05$) у порівнянні з індивідуальними ефектами квінпіролу або домперідону (рис. 4.6). Отримані результати можуть свідчити про позитивний вплив центральної гілки дофамінергічної системи у розвитку та прогресуванні ЗЗК. На сьогоднішній день роль центральної дофамінергічної системи у розвитку

та прогресуванні ЗЗК є недостатньо вивченою. Але, згідно з літературними даними, у пацієнтів з хворобою Паркінсона спостерігалось підвищення рівня прозапальних цитокінів та кишкової проникності, які є характерними ознаками ЗЗК [147].

Висновки до розділу:

1. Активація Д2-ДР квінпіролом та каберголіном мала антивиразковий та антизапальний ефект за умов ЙА-індукованого ВК у щурів.
2. Активація Д2-ДР квінпіролом не впливала на показники епітеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за умов ЙА-індукованого ВК, що визначалось за концентрацією FITC-декстрану (4 кДа) в кровоносному руслі.
3. Активація Д2-ДР квінпіролом пригнічувала екстравазацію альбуміну з кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки щурів при ЙА-індукованому ВК, що свідчить про зменшення ендотеліальної проникності і, відповідно, запалення.
4. Позитивний ефект Д2-ДР на ендотеліальну проникність пов'язаний з переважанням активації центральних над периферичними Д2-ДР.
5. В механізмах Д2-ДР-опосередкованого впливу на ендотеліальну проникність слизової оболонки товстої кишки щурів за ЙА-індукованого коліту залучений Src-кіназний та Akt-кіназний сигнальні шляхи.

РОЗДІЛ 5

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ, ОПОСЕРЕДКОВАНІ АКТИВАЦІЄЮ ДЗ-ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ

5.1. Макро- та мікроскопічні показники перебігу експериментального коліту у щурів за введення агоністу ДЗ-дофамінових рецепторів 7-гідрокси-N,N-дипропіл-2-амінотералін

Як було вищезазначено, ДЗ-ДР були знайдені у великій кількості у СОТК контрольної групи (рис. 3.5), яка відповідає за цілісність кишкового бар'єру, і це може свідчити про протективну роль даного рецептору у патогенезі ЗЗК. Для визначення механізму дії ДЗ-ДР, у нашому дослідженні був застосований селективний агоніст ДЗ-ДР 7-гідрокси-N,N-дипропіл-2-амінотералін (7-ОН-ДРАТ).

7-ОН-ДРАТ - це агоніст ДЗ-ДР, що проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр. Дослідження клінічного перебігу хвороби на 3-й та 7-й дні після підшкірного введення 7-ОН-ДРАТ у дозі 0,02 мг/100 г показало зниження індексу активності хвороби у 1,2 рази ($p < 0,05$) на 3-ю добу експерименту та у 2 рази на 7-му добу експерименту ($p < 0,05$), причому збільшення дози до 0,1 мг/100 г підвищувало індекс активності хвороби у 1,4 рази на 3-й день та у 1,5 рази на 7-й день відповідно (рис. 5.1, А, Б).

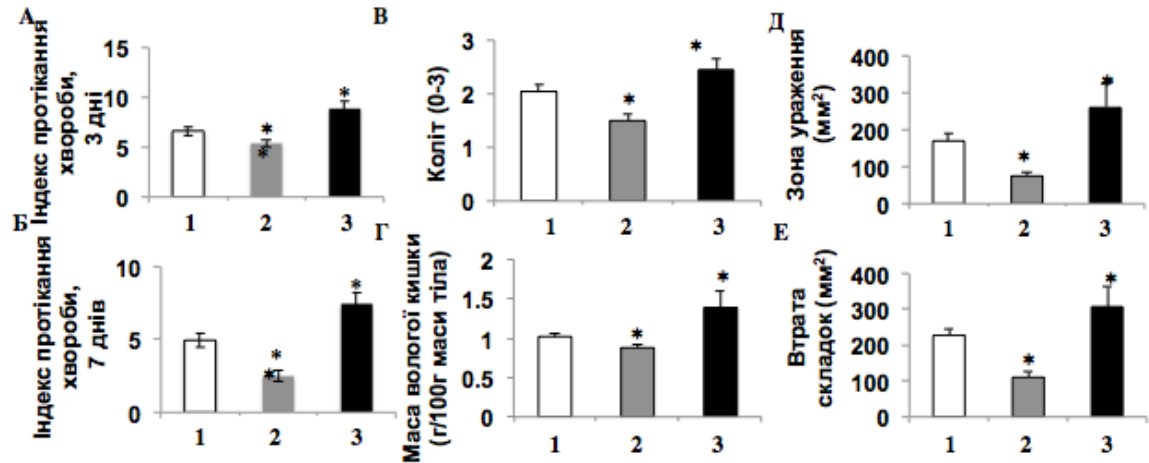


Рис 5.1. Вплив агоністу Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ на клінічні (А, Б) та макроскопічні (В-Е) показники ураження товстої кишки щурів з ЙА-викликаним колітом. 1 – фізіологічний розчин + ЙА; 2 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/кг, п.ш) + ЙА; 3 – 7-ОН-ДРАТ (0,1 мг/кг, п.ш) + ЙА. $M \pm SD$, $n=30$. * - $p < 0,05$, у порівнянні з 1.

При аутопсії оцінювали макроскопічні показники ураження товстої кишки. Було встановлено, що введення 7-ОН-ДРАТ у дозі 0,02 мг/100 г маси тіла зменшувало загальний показник ВК у 1,3 рази ($p < 0,05$), масу вологої кишки (г/100 г маси тіла) у 1,3 рази ($p < 0,05$), ураження ділянки товстої кишки (мм^2) у 2,2 рази ($p < 0,05$) та втрату складчастості товстої кишки (мм^2) у 2,1 рази ($p < 0,05$) (рис 5.1, В-Е).

Отримані результати свідчать про те, що у дозі 0,02 мг/100 г 7-ОН-ДРАТ є ефективним у лікуванні ВК, що також підтверджується результатами гістологічного дослідження (рис. 5.2, А, Б), згідно з якими чітко видно нормалізацію товщини слизового шару та загоєння виразок за введення 7-ОН-ДРАТ на тлі ВК.

Збільшення дози 7-ОН-ДРАТ до 0,1 мг/100 г маси тіла (п.ш.) справляло зворотній ефект, а саме загальний показник ВК був підвищений у 1,2 рази

($p < 0,05$), маса вологої кишки була підвищеною у 1,4 рази ($p < 0,05$), ураження ділянки товстої кишки було збільшеним у 1,5 рази ($p < 0,05$) та втрата складчатості товстої кишки була збільшеною у 1,3 рази ($p < 0,05$) (рис. 5.1, В-Е). Це може свідчити про дозо-залежний ефект агоністу ДЗ-ДР 7-ОН-ДРАТ (рис. 5.1, В-Е).

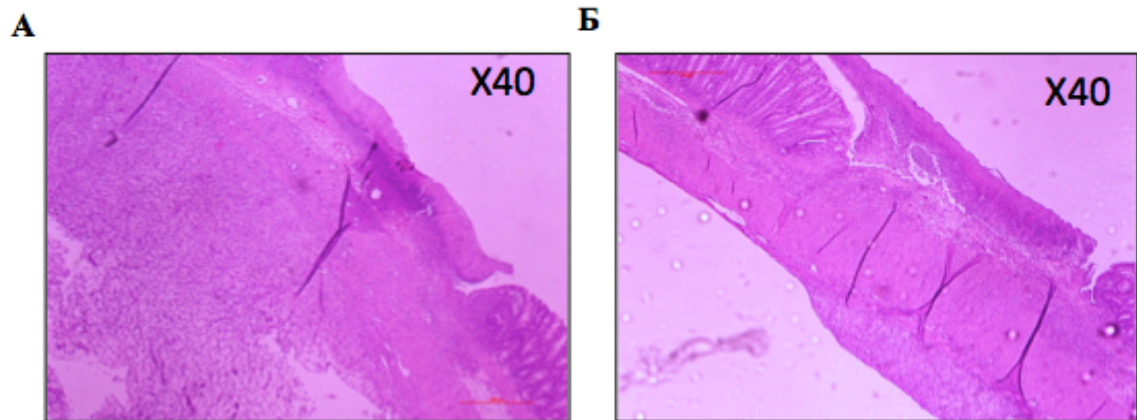


Рис. 5.2. Вплив агоністу ДЗ-ДР 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п/ш) на мікроскопічний показники величини уражень товстої кишки щурів з експериментальним ЙА-викликаним колітом. А – фізіологічний розчин + ЙА; Б – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п/ш) + ЙА. Світлова мікроскопія (гематоксилін-еозин, X40). $n=30$.

Мікроскопічний аналіз величини уражень також вказує на протективну дію 7-ОН-ДРАТ в дозі 0,02 мг/100 г що проявляється видимим потоншенням та візуальним зниженням кількості виразок СОТК щурів за умов ЙА-викликаного ВК (Рис. 5.2, А, Б).

5.2. Вплив ДЗ-дофамінових рецепторів на рівень та біохімічний склад слизу товстої кишки щурів за умов експериментального коліту

Зміни кількості глікопротеїнів та гексоз за ЗЗК відповідають змінам структури слизового шару, що може призводити до вивільнення прозапальних цито- та хемо-кінів (IL-1, IL-6, IL-8) епітеліальними клітинами товстої кишки, викликаного підвищеною стимуляцією антигеном [148]. Також відомо, що ЗЗК характеризуються зниженням кількості фукоз, тоді як сіалові кислоти та гексозаміни залишаються незмінними [61]. Розвиток запалення товстої кишки за умов ЙА-викликаного ВК характеризувався чітко визначеними у часі морфо-функціональними змінами, асоційованими з розвитком гострого (0,5–6 год) та хронічного запалення (3-14 день), зокрема: збільшення ендотеліальної та епітеліальної проникності, інфільтрації лейкоцитів у слизову оболонку тощо [168].

5.2.1. Біохімічний склад слизу товстої кишки щурів за експериментального коліту

Враховуючи той факт, що ДЗ-ДР були знайдені нами у великій кількості на келихоподібних клітинах, що продукують слиз, ми дослідили відносний вміст та біохімічний склад глікопротеїнів поверхневого слизу.

Для дослідження відносного вмісту глікопротеїнів поверхневого слизу в різні терміни ЙА-індукованого ВК, ми застосували ШИФ-реагент. Метод заснований на виявленні вуглеводного компоненту глікопротеїнів слизу шляхом окиснення спиртових груп, що перетворюються на альдегідні групи і візуалізуються завдяки кольоровій реакції з ШИФ-реагентом.

Нами було показано достовірне підвищення відносного вмісту глікопротеїнів поверхневого слизу через 0,5 год у 1,8 разів ($p < 0,05$) після індукції ВК, яке супроводжувалося різким зниженням продукції слизу через 2 год у 7 разів ($p < 0,05$) та 3 дні у 2,8 разів ($p < 0,05$) після індукції ВК (рис. 5.3). Через 7 днів після індукції ВК відносний вміст глікопротеїнів поверхневого слизу достовірно підвищувався у 2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем (МЦ).

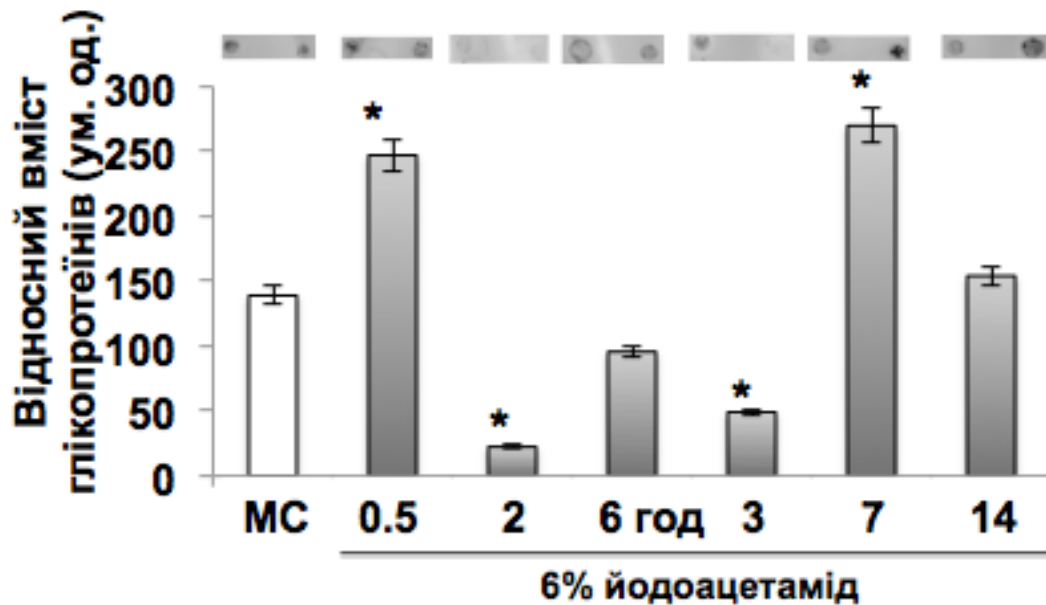


Рис. 5.3. Відносний вміст глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни ЙА-індукованого коліту ($M \pm SD$, $n=24$), * - $p < 0,05$ відносно контролю (МЦ). Метод ШИФ-реакції на PVDF-мембрані.

Отримані дані можна пояснити захисною реакцією слизової оболонки товстої кишки за гострої фази ВК (0,5 год), що проявляється у підвищеній продукції слизу келихоподібними клітинами. Також спостерігалася підвищена продукція слизу за хронічної стадії хвороби (7 днів), що може свідчити про відновлення нормального функціонування слизової оболонки товстої кишки щурів.

Для кількісного дослідження концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів був застосований реактив Фоліна, що виявляє саме білкову складову в структурі глікопротеїну.

Було встановлено вірогідне зростання концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів починаючи з 6-ї години після індукування ВК (у 1,7 разів, $p < 0,05$), яке трималось на плато на 3-й (збільшення у 2 рази, $p < 0,05$) та 7-й день експерименту (збільшення у 1,8 разів, $p < 0,05$) (рис. 5.4). Це свідчить про активацію келихоподібних клітин СОТК, які в нормі секретують слиз, у відповідь на появу хвороботворного чинника.

Оскільки муцини є основною складовою поверхневого слизу [63], можна говорити про зростання загальної кількості слизу товстої кишки щурів на тлі ЙА-індукованого ВК на стадіях хронічного перебігу хвороби.

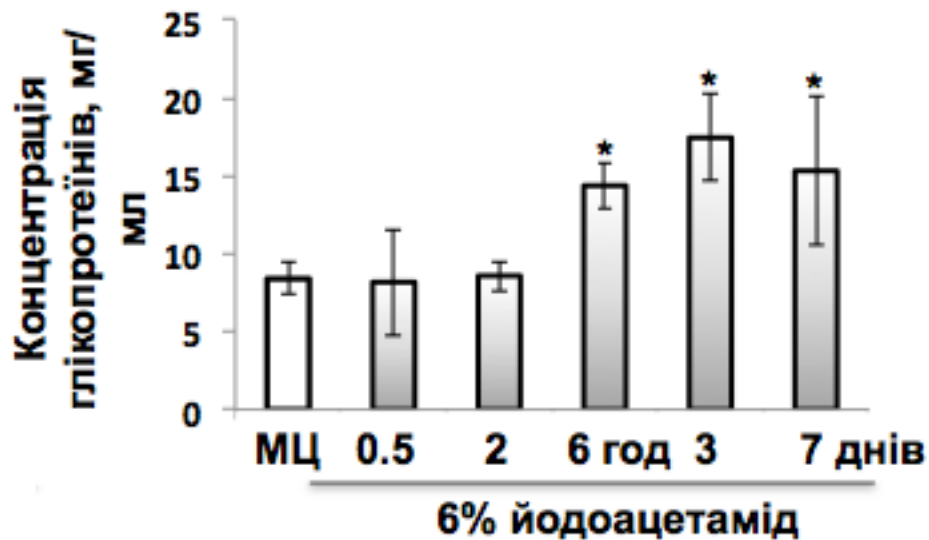


Рис. 5.4. Концентрація глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів на фоні ЙА-індукованого коліту за різних термінів, $M \pm SD$, $n=24$. * - $p < 0,05$ відносно контролю. Реакція з реактивом Фоліна.

З метою дослідження якісного складу глікопротеїнової частини слизу, зокрема структури гліканів, що відповідають за в'язкість слизу, ми вивчали

концентрацію гексоз, гесозамінів, фукоз та сіалових кислот у складі слизу за гострого (0,5-6 год) та хронічного (7, 14 днів) запалення в товстій кишці щурів.

Кількісне визначення концентрації гексоз вказує на значне підвищення кількості цих сполук у 7,7 разів ($p<0,05$) на 3-й та у 5,5 разів ($p<0,05$) на 7-й день після індукування ВК в порівнянні з контролем (рис. 5.5).

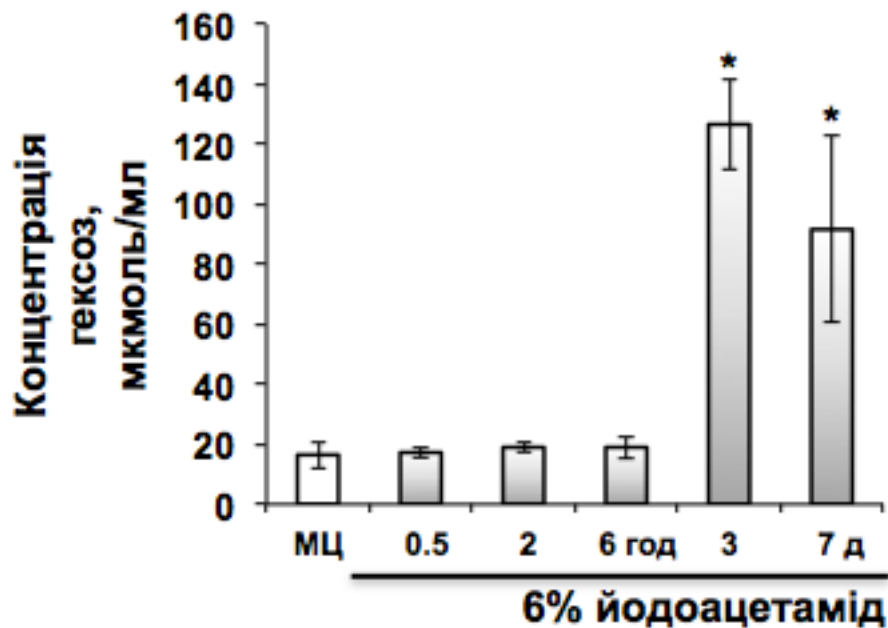


Рис. 5.5. Концентрація гексоз поверхневого слизу товстої кишки щурів на фоні ЙА-індукованого коліту за різних термінів, $M\pm SD$, $n=24$. * - $p<0,05$ відносно контролю

Навпаки, концентрація фукози в складі поверхневого слизу товстої кишки щурів різко знижувалася у 3,3 рази ($p<0,05$) через 6 год. Спостереження у більш віддалені терміни ВК (хронізація процесу запалення) виявили подальше зменшення концентрації фукоз у складі слизу. Так на 3-й день після початку експерименту їх кількість була зменшена у 4 рази ($p<0,05$), на 7-й день - у 7,5 разів ($p<0,05$) (рис. 5.6).

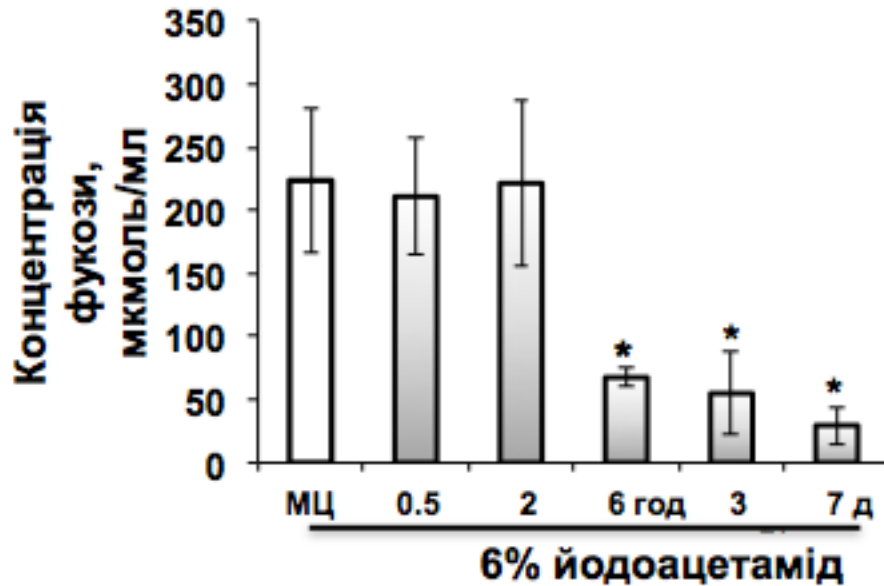


Рис. 5.6. Концентрація фукоз поверхневого слизу товстої кишки щурів на фоні ЙА-індукованого виразкового коліту за різних термінів, $M \pm SD$, $n=24$. * - $p < 0,05$ відносно контролю

Визначення концентрації гексозамінів поверхневого слизу щурів виявило поступове зростання рівня цих сполук у складі поверхневого слизу товстої кишки щурів. Вже через 0,5 год після індукування ВК показано збільшення концентрації гексозамінів у 2,4 рази ($p < 0,05$) відносно контрольної групи.

У подальшому тенденція зберігалася і спостерігалася зростання концентрації гексозамінів у 2,4-рази ($p < 0,05$) через 2-і, у 2,9 разів ($p < 0,05$) через 6 год, у 3,2 рази ($p < 0,05$) на 3-й та у 3,9 разів ($p < 0,05$) на 7-й день від початку експерименту в порівнянні з відповідними показниками у контрольних тварин (рис. 5.7).

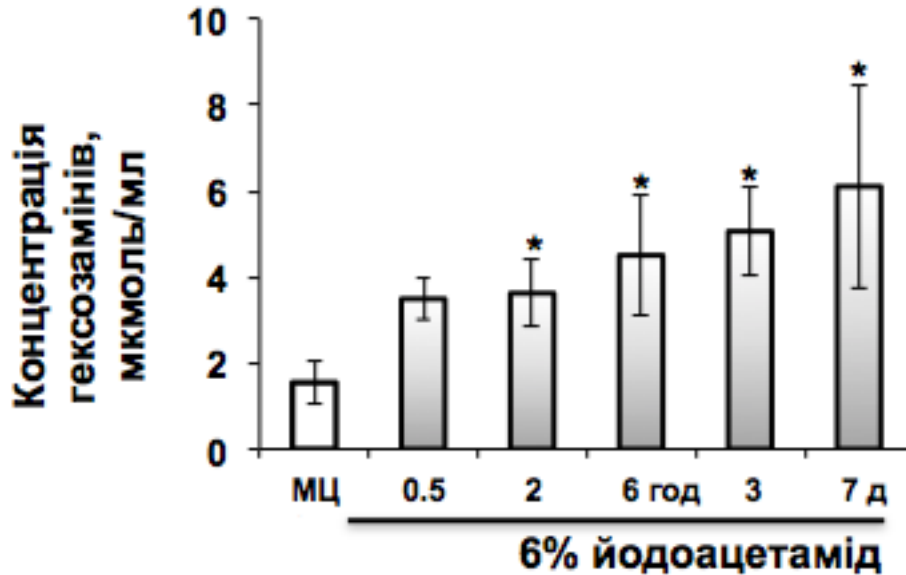


Рис. 5.7. Концентрація гексозамінів поверхневого слизу товстої кишки щурів на фоні ЙА-індукованого виразкового коліту за різних термінів, $M \pm SD$, $n=24$. * - $p < 0,05$ відносно контролю

Крім того, нами було показано зростання концентрації сіалових кислот у 1,4 рази ($p < 0,05$) через 6 год, у 1,3 рази на 3-й ($p < 0,05$) та у 1,7 разів ($p < 0,05$) на 7-й день після початку експерименту в порівнянні з контролем (рис. 5.8).

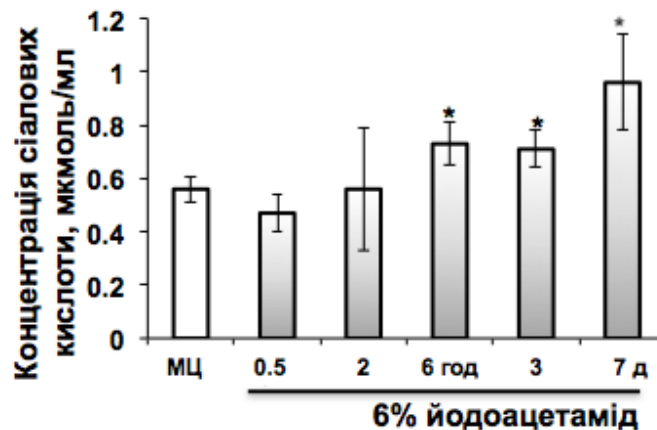


Рис. 5.8. Концентрація сіалових кислот слизу товстої кишки щурів на фоні ЙА-індукованого коліту за різних термінів, $M \pm SD$, $n=24$. * - $p < 0,05$ відносно контролю

Зростання кількості загальних глікопротеїнів поверхневого слизу збігалось у часі зі стрибкоподібним падінням вмісту фукози та зростанням кількості сіалових кислот у складі вуглеводних ланцюгів муцинів. Це вказувало на активацію процесів секреції муцинів із менш розгалуженою вуглеводною частиною.

Зростання кількості загальних глікопротеїнів поверхневого слизу збігалось у часі зі стрибкоподібним падінням вмісту фукози та зростанням кількості сіалових кислот у складі вуглеводних ланцюгів муцинів. Це вказує на активацію процесів секреції муцинів із менш розгалуженою вуглеводною частиною.

Незважаючи на зростання загальної кількості муцинів та значне подовження в вуглеводних ланцюгах за рахунок зростання рівня гексоз, такий слиз стає менш щільним і за рахунок низького ступеня розгалуженості, ймовірно, гірше утримується на поверхні епітеліальних клітин [190]. Крім того, зменшення кількості бічних вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів збільшує доступність епітелію для мікроорганізмів та чужорідних макромолекул, що, в свою чергу, підтримує хронічний перебіг запального процесу [150].

5.2.2. Біохімічний склад слизу товстої кишки щурів за введення агоністу ДЗ-дофамінових рецепторів – 7-ОН-ДРАТ за умов йодоацетамід-індукованого коліту

Враховуючи той факт, що ДЗ-ДР були знайдені у великій кількості на келихоподібних клітинах, що продукують слиз, кількісний і якісний склад якого є провідним захисним чинником в патогенезі ЗЗК [192], далі ми дослідили роль ДЗ-ДР в підтриманні його рівня при експериментальному ВК.

Кількісне визначення концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу

товстої кишки щурів визначали за реакцією з реактивом Фоліна після ізоляції глікопротеїнів сульфасаліциловою кислотою та їх преципітації фосфорновольфрамовою кислотою [124].

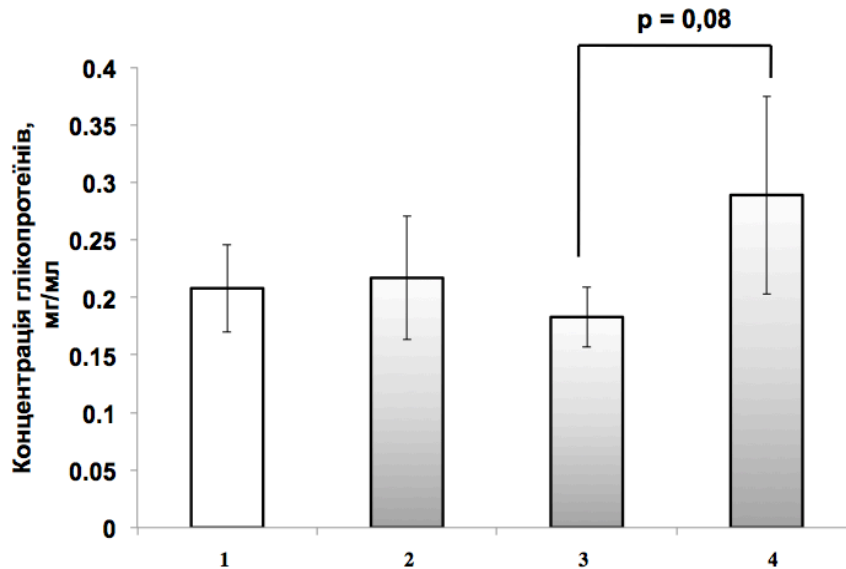


Рис. 5.10. Вплив агоніста ДЗ-ДР 7-ОН-ДРАТ на концентрацію глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів в нормі та за умов ЙА-викликаного коліту, $n=12$. 1 – контроль (МЦ), 2 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.), 3 – 6% ЙА, 4 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) + 6% ЙА. $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно контролю. # - $p < 0,05$ відносно ЙА. Реакція з реактивом Фоліна.

Нами встановлено, що за введення 7-ОН-ДРАТ спостерігалася тенденція до збільшення концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів у 1,5 рази ($p=0,08$) (рис. 5.10). Отримані зміни можуть бути пояснені підвищенням концентрації білкової частини глікопротеїнів поверхневого слизу за активації ДЗ-ДР за умов ЙА-індукованого запалення.

Також було показано, що концентрація гексоз поверхневого слизу щурів за ЙА-індукованого ВК була у 1,2 рази ($p < 0,05$) зниженою у порівнянні з контрольною групою, якій вводили МЦ (рис.5.11). За введення 7-ОН-ДРАТ

щурам з ЙА-викликаним ВК кількість гексоз була достовірно зниженою у 1,27 разів ($p < 0,05$) порівняно з групою експериментального ВК. Це могло б вказувати на протективну роль агоністу Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ через підвищення секреції слизу на тлі експериментального ВК.

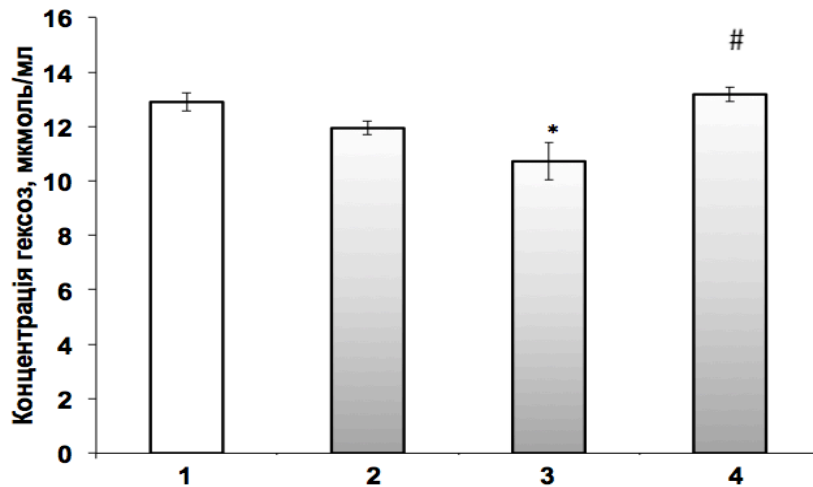


Рис. 5.11. Вплив агоніста Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ на концентрацію гексоз поверхневого слизу товстої кишки щурів в нормі та за умов ЙА-викликаного виразкового коліту, $n=12$. 1 – контроль (МЦ), 2 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.), 3 – 6% ЙА, 4 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) + 6% ЙА. $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно контролю. # - $p < 0,05$ відносно ЙА.

Отже, нами було вперше показано, що попереднє введення агоніста Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ стимулювало зростання вмісту білкової частини глікопротеїнів, що корелювало зі збільшенням концентрації гексоз за умов ЙА-індукованого запалення.

5.3. Цитохімічне визначення стану келихоподібних клітин за введення агоністу Д3-дофамінових рецепторів – 7-ОН-ДРАТ за умов експериментального коліту

Келихоподібні клітини знаходяться у великій кількості у криптах СОТК і виділяють слиз. Ми дослідили стан келихоподібних клітин за умов ЙА-викликаного ВК та за введення агоністу Д3-ДР на фоні ВК.

Нами було показано, що через 30 хв після індукції ВК товщина слизової оболонки зростала, мабуть, внаслідок набряку. Спостерігалось зниження площі перетину келихоподібних клітин у 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно контролю (Рис. 5.11).

Введення агоніста Д3-ДР за умов ЙА-індукованого ВК призводило до достовірного зниження площі перерізу келихоподібних клітин відносно контролю у 1,3 ($p < 0,05$) та відносно групи з ВК у 1,2 рази ($p < 0,05$).

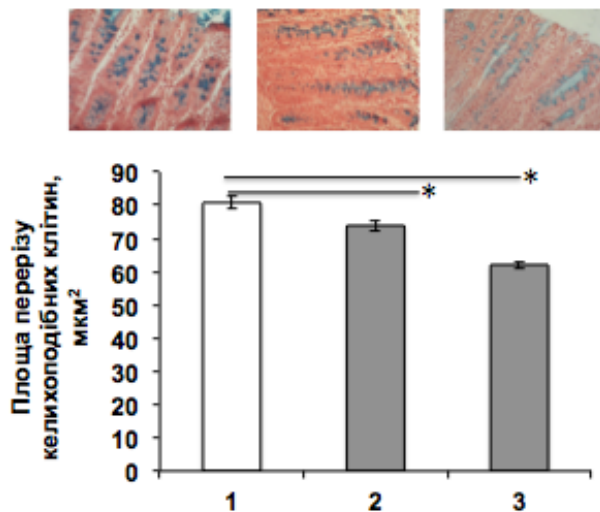


Рис. 5.11. Вплив агоніста Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ на площу перерізу келихоподібних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів в нормі та за умов ЙА-викликаного коліту, $n=12$. 1 – контроль (МЦ), 2 – 6% ЙА, 3 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) + 6% ЙА. $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно 1.

Отже, введення агоніста 7-ОН-DPAT призводило до достовірного зниження площі перерізу келихоподібних клітин відносно контролю та групи з ВК. Це свідчить про те, що ефект активації ДЗ-ДР на продукцію поверхневого слизу скоріше за все пов'язаний зі стимулюванням його вивільнення келихоподібними клітинами. І не пов'язаний зі збільшенням секреторної функції келихоподібних клітин, адже їх площа перерізу зменшувалася за умов введення агоністу 7-ОН-DPAT.

5.4. Вплив ДЗ-дофамінових рецепторів на активність перитоніальних макрофагів за умов експериментального коліту у щурів

Відомо, що макрофаги відіграють важливу роль у захисті внутрішнього середовища організму. Їх функція визначається здатністю регулювати діяльність інших систем – імунної, фібрінолізу, а також здатністю інтенсивно поглинати і переробляти чужорідні сполуки, які потрапляють в організм. Якщо при знищенні бактерій наряду з макрофагами важливу роль відіграють нейтрофільні лейкоцити, то дезінтоксикація – процес, пов'язаний тільки з функцією системи фагоцитуючих мононуклеарів. Очевидно, вони являються сигнальними клітинами, що першими вловлюють порушення внутрішньотканинного гомеостазу і повідомляють про це іншим клітинним системам.

Нами було показано, що функціональний резерв макрофагів, який складається з спонтанної та індукованої активності, був достовірно підвищеним у групі щурів, яким вводили 7-ОН-DPAT через 0,5 год у 1,6 рази ($p < 0,05$) після введення ЙА (Рис. 5.12).

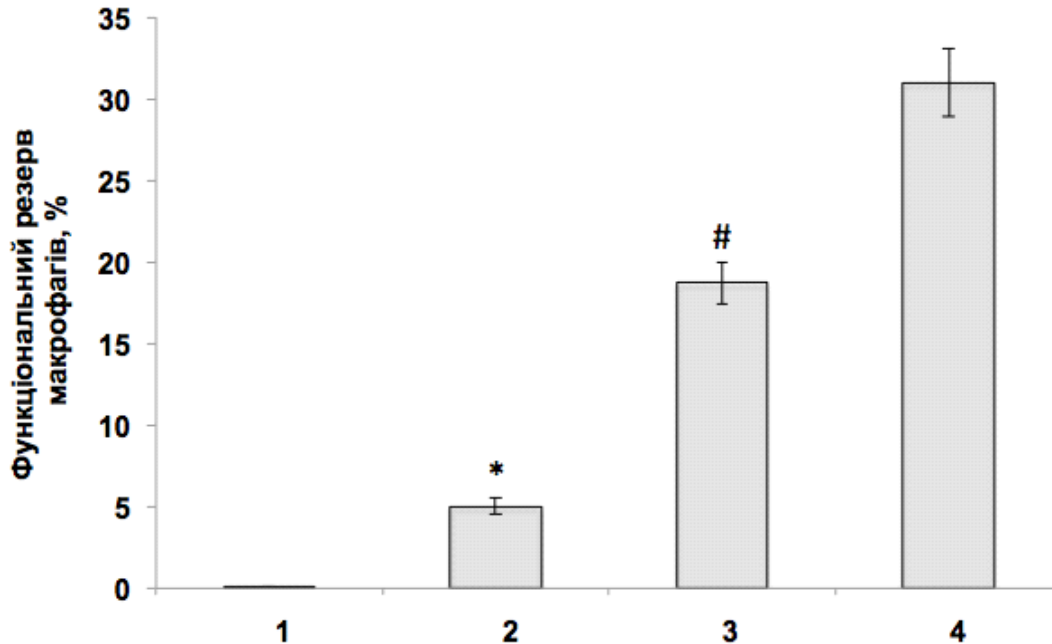


Рис. 5.12. Вплив агоніста Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) на функціональний резерв макрофагів у щурів за умов ЙА-індукованого коліту, $n=18$. 1 – контроль (МЦ), 2 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.), 3 – 6% ЙА, 4 – 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) + 6% ЙА. $M \pm SD$, * - $p < 0,05$ відносно 1, # - $p < 0,05$ відносно 2, & - $p < 0,05$ відносно 3.

Отримані результати можуть вказувати на роль 7-ОН-ДРАТ у механізмі стимуляції первинної відповіді імунної системи на патоген (Рис. 5.12), що може свідчити про протективну роль агоністу Д3-ДР у лінії первинного захисту організму і клітинного потенціалу до повторної імунної відповіді на дію подразника.

В дослідженнях на первинній культурі макрофагів людини було встановлено експресію Д3-ДР та Д4-ДР, а також ТН і ДАТ. Причому дофамін збільшував секрецію IL-6, CCL2, CXCL8 та IL-10 і знижував - TNF- α в макрофагах стимульованих ліпополісахаридом (LPS) [155], що співпадає з отриманими нами даними.

5.5. Цитохімічне визначення стану тучних клітин за введення агоністу Д3-дофамінових рецепторів – 7-ОН-ДРАТ за умов експериментального коліту

Тучні клітини є високоспеціалізованими імунними клітинами сполучної тканини хребетних тварин, які приймають участь в адаптивному імунітеті і відіграють важливу роль у запальних реакціях. Даний тип клітин характеризується великою кількістю цитоплазматичних гранул, які вивільняються в оточуючу тканину при їх активації (дегрануляція). Вихід цих речовин призводить до зміни стану міжклітинної речовини сполучної тканини гематотканинного бар'єру.

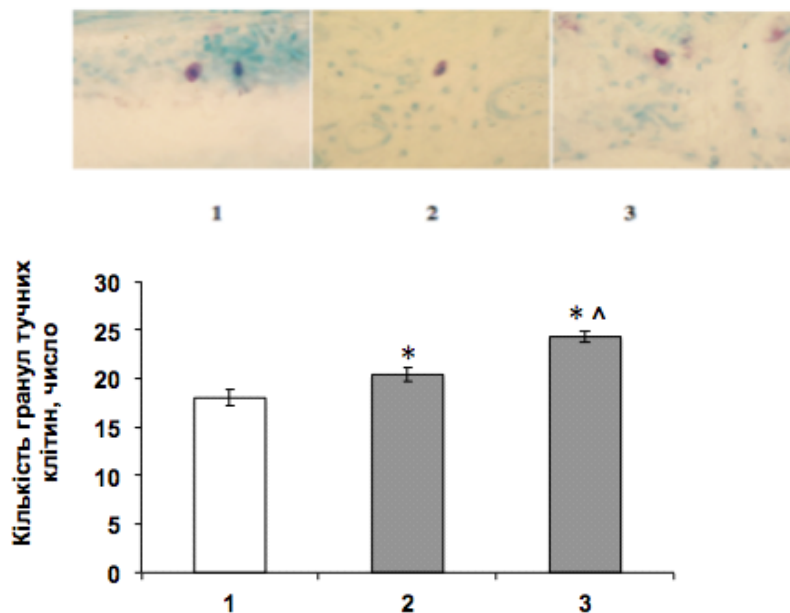


Рис. 5.13. Вплив агоніста Д3-ДР 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) на кількість гранул тучних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів в нормі та за умов ЙА-викликаного коліту, n=12. 1 – контроль (МЦ), 2 – 6% ЙА, 3 - 7-ОН-ДРАТ (0,02 мг/100 г, п.ш.) + 6% ЙА. M±SD, * - p <0,05 відносно 1. ^ - p <0,05 відносно 2.

Було показано, що за введення агоністу ДЗ-ДР кількість гранул збільшувалася у 1,2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем. За введення агоністу ДЗ-ДР за умови ЙА-індукованого ВК спостерігалось достовірне збільшення кількості гранул у 1,4 рази ($p < 0,05$) відносно контролю та у 1,2 рази ($p < 0,05$) відносно групи ВК (Рис. 5.13). На фоні збільшення кількості гранул тучних клітин ступінь дегрануляції не досліджувався, але ми припускаємо, що відбувалося лише накопичення секрету гранул тучних клітин без його подальшого вивільнення. Отже, можливо, за введення ДЗ-ДР агоністу за умов ЙА-викликаного ВК стимуляція запалення шляхом вивільнення секрету тучних клітин, не відбувалася.

Висновки до розділу:

1. Активація ДЗ-ДР селективним агоністом 7-ОН-ДРАТ в низькій дозі (0,02 мг/100 г) на противагу більшій дозі (0,1 мг/100 г) викликала достовірне зниження клінічних, макро- та мікро- скопічних проявів ЙА-індукованого ВК у щурів.

2. Виявлено поступово прогресуючі зміни загальної кількості глікопротеїнів та вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни ЙА-індукованого ВК. Вони проявлялися у зростанні концентрації глікопротеїнів, гексоз, гексозамінів, сіалових кислот на тлі падіння рівня фукози.

3. Встановлено, що активація ДЗ-ДР введенням 7-ОН-ДРАТ призводила до збільшення концентрації глікопротеїнів та гексозамінів за умов експериментального ВК.

4. Встановлено, що ефект активації ДЗ-ДР на продукцію поверхневого слизу не пов'язаний зі збільшенням секреторної функції келихоподібних клітин, адже площа перерізу келихоподібних клітин зменшувалася за умов введення 7-ОН-ДРАТ.

5. Показано, що активація ДЗ-ДР введенням 7-ОН-ДРАТ призводила до підвищення клітинного потенціалу до повторної імунної відповіді на дію подразника, що опосередковувалася через підвищення функціонального потенціалу перитонеальних макрофагів на тлі ЙА-індукованого ВК.

6. Показано, що за введення ДЗ-ДР агоністу 7-ОН-ДРАТ кількість гранул тучних клітин збільшувалася на тлі ЙА-індукованого ВК, проте, скоріше за все, стимуляція запалення шляхом вивільнення секрету тучних клітин, не відбувалася.

РОЗДІЛ 6

БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ КОЛІТІ ЗА УМОВ РУЙНУВАННЯ ПЕРИФЕРИЧНИХ ДОФАМІНЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ

6.1. Встановлення ролі периферичної дофамінергічної системи в патогенезі експериментального коліту

6.1.1. Рівень тирозинової гідроксилази у мозку та товстій кишці щурів за руйнування периферичної дофамінергічної системи шляхом введення 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МРТР)

Синтез дофаміну залежить від ступеню перетворення амінокислоти тирозину в попередник дофаміну L-ДОФА, який здійснюється ферментом ТН [33]. Дослідження на сиптактомованих тваринах разом з визначенням не-нейрональних та ТН-позитивних клітинах та вимірюванням рівнів метаболіту дофаміну 3,4-дигідроксифенілацетильної кислоти (ДОФАК) показали, що дофамінергічна активність на периферії залежить від синтезу попередників норепінефрину/епінефрину [151].

Для того, щоб зруйнувати периферичну дофамінергічну систему щурам підшкірно вводили нейротоксин МРТР, який використовується для індукування експериментального паркінсонізму.

Згідно літературних джерел, в дозі 4 x 20 мг/кг МРТР не викликав достовірних змін у центральних дофамінергічних нейронах, але знижував

число ентеральних ТН-позитивних нейронів, а також концентрацію дофаміну у тонкій кишці, стравоході та шлунку [152]. Нами було показано, що рівні ТН були достовірно знижені у 1,5 рази ($p < 0,05$) товстій кишці, але залишалися незмінними у мозку щурів, яким вводили МРТР (рис. 6.1, А, Б), що підтверджує руйнування периферичних дофамінергічних нейронів.

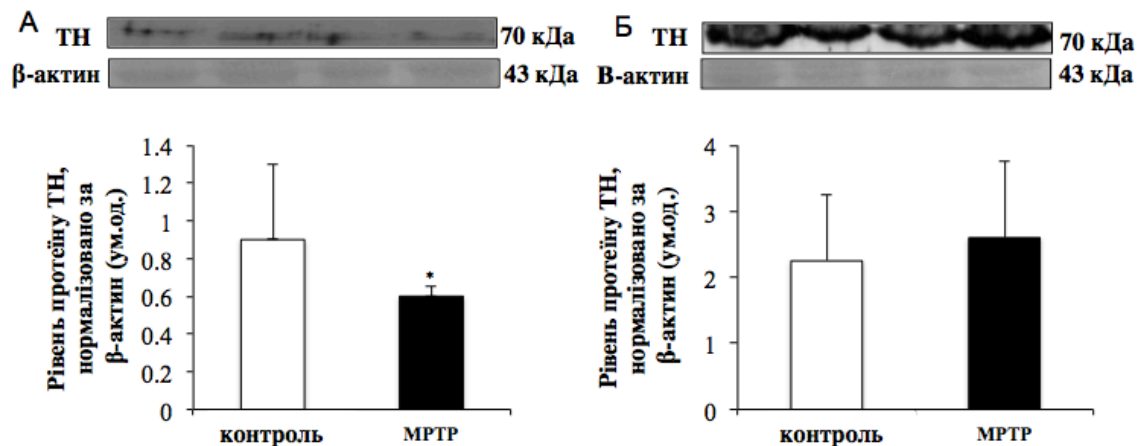


Рис. 6.1. Рівень протеїну тирозинової гідроксилази (ТН) у товстій кишці (А) та мозку (Б) щурів після введення нейротоксину 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МРТР, 4 x 20 мг/кг, п.ш.). * - $P < 0.05$ у порівнянні з контрольною групою.

За літературними даними відомо, що не тільки дофамінергічні, а й норадренергічні нейрони руйнуються при паркінсонізмі. У той час, коли більшість дофамінергічних нейронів зруйновано, включається компенсаторний механізм продукції ТН норадренергічними нейронами. Цей механізм допомагає відстрочити зниження рівнів дофаміну в мозку та розвиток хвороби; з часом розвитку хвороби норадренергічні нейрони також руйнуються [153].

6.1.2. Клінічні та макроскопічні показники перебігу експериментального коліту у щурів за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР

Для перевірки ролі периферичної дофамінергічної системи у патогенезі ВК, у щурів з ЙА-викликаним ВК руйнували периферичні нейрони шляхом введення нейротоксину МРТР. Було показано, що щури, яким вводили МРТР, мали більш виражені клінічні прояви ВК, ніж контрольні щури після введення ЙА. Клінічний індекс протікання хвороби був у 1,35 разів ($p < 0,05$) підвищений у групі щурів, яким вводили МРТР за умови ЙА-викликаного ВК через 3 дні та у 1,8 разів ($p < 0,05$) через 7 днів після індукції ВК (рис. 6.2, А). В той же час, макроскопічні ознаки ВК були достовірно меншими у 1,8 разів ($p < 0,05$) у щурів, яким вводили МРТР, ніж у щурів, яким вводили фізіологічний розчин (рис. 6.2, Б). У клінічній та макроскопічній оцінці у щурів, яким вводили МРТР або фізіологічний розчин після введення МЦ, не було помічено достовірних змін (рис. 6.2, В-Г).

Також ми перевірили активність мієлопероксидази (МПО), що є класичним маркером інфільтрації нейтрофілів в СОТК.

У нашому дослідженні активність МПО у СОТК щурів, не змінювалася у щурів з ЙА-індукованим ВК, яким вводили МРТР або фізіологічний розчин (рис. 6.3).

Отже, руйнування дофамінергічних нейронів на периферії призводило до покращення морфологічних ознак ВК у щурів.

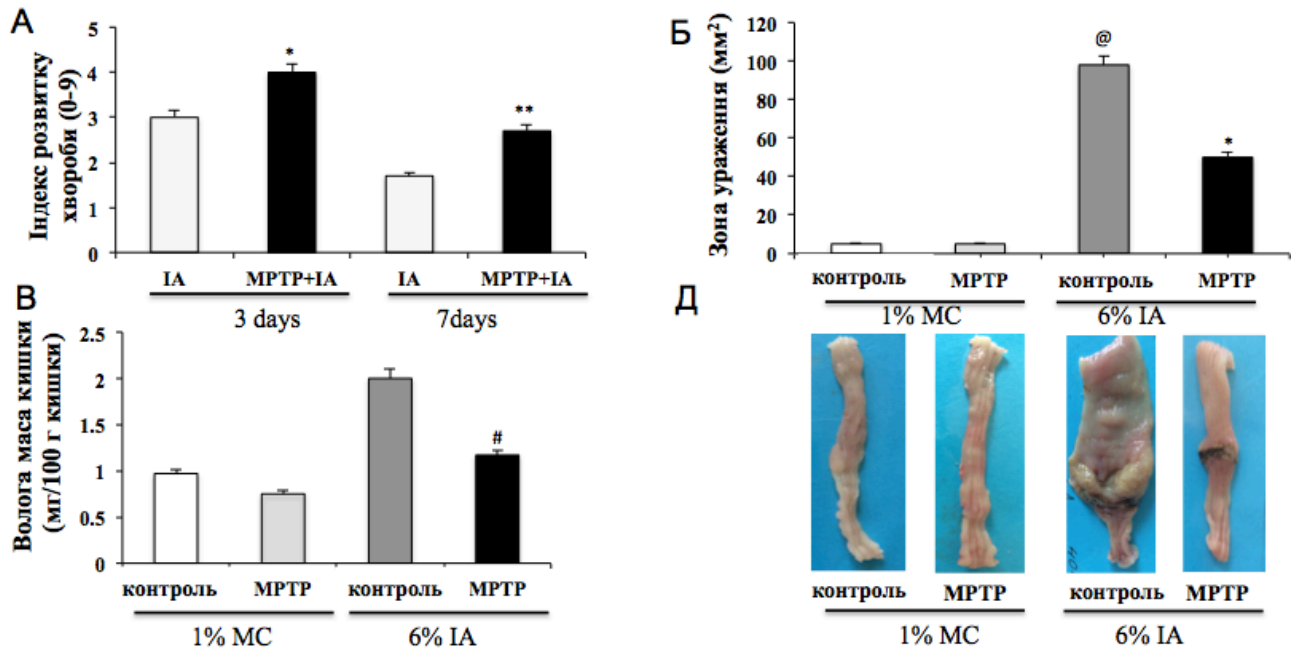


Рис. 6.2. Клінічні та макроскопічні прояви експериментального коліту у щурів, яким вводили фізіологічний розчин та/або МРТР: (А) індекс перебігу хвороби; (Б) розмір уражень товстої кишки; (В) маса вологої товстої кишки мг/100г кишки (Г) макроскопічне виявлення виразкоутворення товстої кишки через 10 днів після введення ЙА. ($M \pm SD$, @ - $P < 0,05$ – у порівнянні з контрольною групою. * – $P < 0,05$, у порівнянні з групою з експериментальним колітом (3 дні коліту), ** - $P < 0,05$, у порівнянні з групою з експериментальним колітом (10 днів коліту). # - $P < 0,05$ у порівнянні з групою з експериментальним колітом. Зміни макроскопічних та клінічних проявів розвитку експериментального коліту у контрольних щурів та щурів, яким вводили МРТР (20 мг/кг, п.ш.).

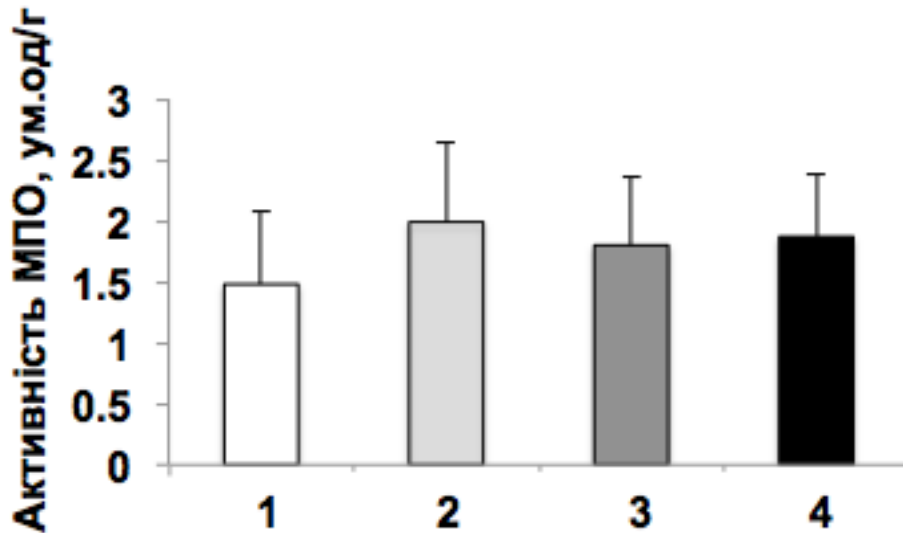


Рис. 6.3. Активність мієлопероксидази (МПО) у слизовій оболонці кишечника щурів з хімічно зруйнованими нейронами периферичної дофамінергічної системи (МРТР) за умов ЙА-індукованого коліту, $M \pm SD$. 1 – контроль (МЦ); 2 – МРТР (20 мг/кг, п.ш.); 3 – 6% ЙА; 4 – МРТР + 6% ЙА

Погіршення клінічних ознак хвороби, показаних нами (летаргія, втрата маси тіла) у щурів, яким вводили МРТР, надає підставу для розмірковувань щодо позитивної ролі центральної дофамінергічної системи у патогенезі ВК, що і потребують подальших досліджень і підтвердження.

6.2. Біохімічні та імунологічні показники фагоцитів периферичної крові щурів при експериментальному коліті за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР

Для визначення механізму, що опосередковує покращення морфологічних ознак ЙА-викликаного ВК у щурів зі зруйнованими периферичними нейронами, ми перевірили основні параметри імунологічної відповіді за розвитку ВК.

6.2.1. Біохімічні та імунологічні показники гранулоцитів периферичної крові щурів при експериментальному коліті за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР

У периферичній крові щурів, яким вводили МРТР, а також у щурів, яким вводили фізіологічний розчин, розвиток ЙА-індукованого ВК був асоційованим з достовірним підвищенням фагоцитуючих гранулоцитів (в основному, нейтрофілів) у 7,9 разів ($p < 0,05$) та у 7 разів ($p < 0,05$) відповідно та респіраторним вибухом у 1,5 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою (рис. 6.4, А, Б). У той же час, у групі щурів без ВК, яким вводили МРТР, число гранулоцитів у фагоцитозі було зниженим у 1,7 разів ($p < 0,05$).

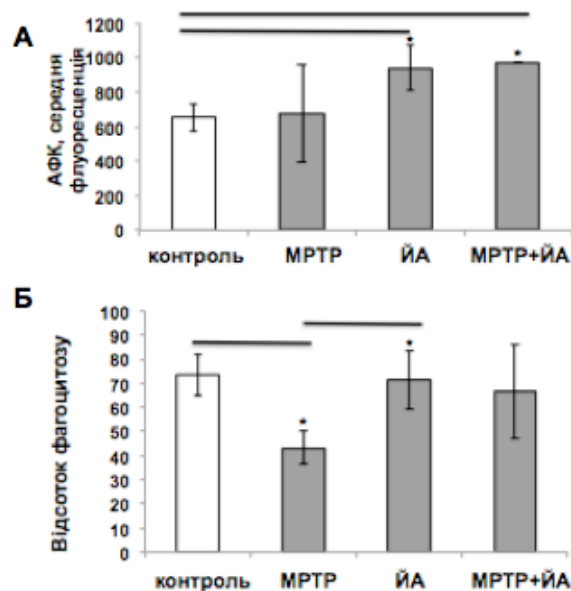


Рис. 6.4. Профіль периферичних гранулоцитів крові щурів, яким вводили фізіологічний розчин та/або МРТР на тлі експериментального коліту: А – продукція внутрішньоклітинних АФК; Б – відсоток фагоцитозу; $M \pm SD$, * - $p < 0,05$

Для подальшого аналізу профіля гранулоцитів ми перевірили число CD69 позитивних гранулоцитів та інтенсивність поверхневої експресії CD69.

CD69 є раннім маркером активації антигену на Т та В клітинах, який також експресується на активованих макрофагах та нейтрофілах. Було показано, що у мишей, дефіцитних за геном CD69, розвивалося менш виражене ураження та запалення легень, викликане блеоміцином, ніж у мишей дикого типу [154].

Нами було показано, що число CD69 позитивних гранулоцитів (рис. 6.5, Б) та інтенсивність поверхневої експресії CD69 (рис. 6.5, Г) мали схожу картину у МРТР групі та у групі щурів, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК, але були достовірно підвищені у 6,1 ($p < 0,05$) та у 5,3 рази ($p < 0,05$), відповідно, відносно контрольної групи тварин. Інтенсивність поверхневої експресії CD69 була також підвищеною у щурів без експериментального ВК, яким вводили МРТР (рис. 6.5, Г).

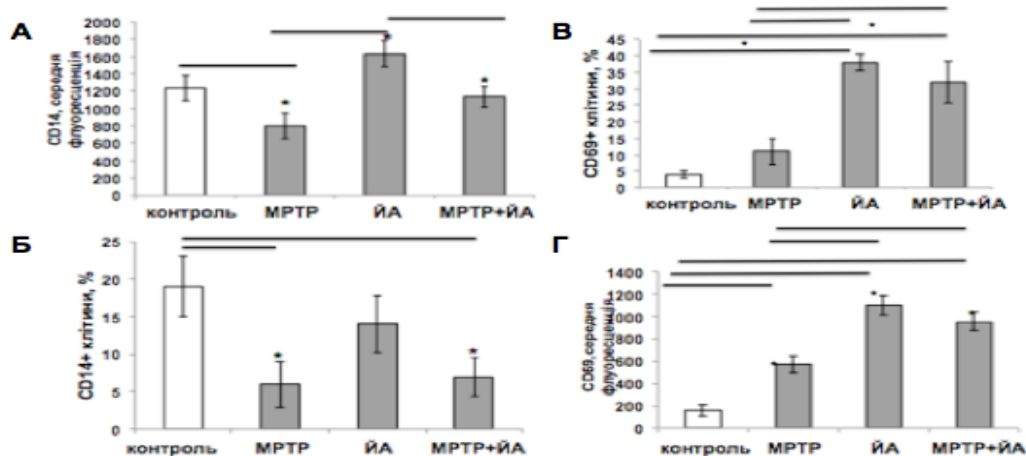


Рис. 6.5. Профіль периферичних гранулоцитів крові щурів, яким вводили фізіологічний розчин та/або МРТР на тлі експериментального коліту: А та Б - число CD14+ клітин та поверхнева експресія CD14 відповідно; В та Г – число CD69+ клітин та поверхнева експресія CD69 відповідно; $M \pm SD$, * - $p < 0,05$

CD14 експресується на мембрані і є найважливішим рецептором до ліпополісахариду на моноцитах та нейтрофілах людини.

Нами було показано, що руйнування периферичної дофамінергічної системи у щурів, яким вводили МРТР, було асоційоване з достовірним зниженням числа CD14 позитивних гранулоцитів у 3,1 рази ($p < 0,05$) та інтенсивності поверхневої експресії CD14 у 1,6 разів ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 6.5, А, В).

Окрім того, ці параметри були достовірно зниженими у щурів, яким вводили МРТР у порівнянні з щурами, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК (рис. 6.5, А, В).

6.2.2. Біохімічні та імунологічні показники моноцитів периферичної крові щурів при експериментальному коліті за умови руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення МРТР

Нами було показано, що руйнування периферичної дофамінергічної системи у щурів, яким вводили МРТР, було асоційованим з сильним зниженням у 2,5 рази ($p < 0,05$) продукції АФК циркулюючими моноцитами (рис. 6.6, А), в той час, як активність фагоцитозу (рис. 6.6, Б) і число моноцитів у фагоцитозі залишалися незмінними у порівнянні з контрольними тваринами.

Більше того, продукція АФК циркулюючими моноцитами була також зниженою у щурів, яким вводили МРТР у порівнянні зі щурами, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК, але цей параметр не був підтверджений статистично (рис. 6.6, А).

Отримані дані вказують на антизапальний профіль моноцитів, що може пояснювати менш виражені коліт-асоційовані ураження товстої кишки у щурів,

яким вводили МРТР порівняно з щурами, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК.

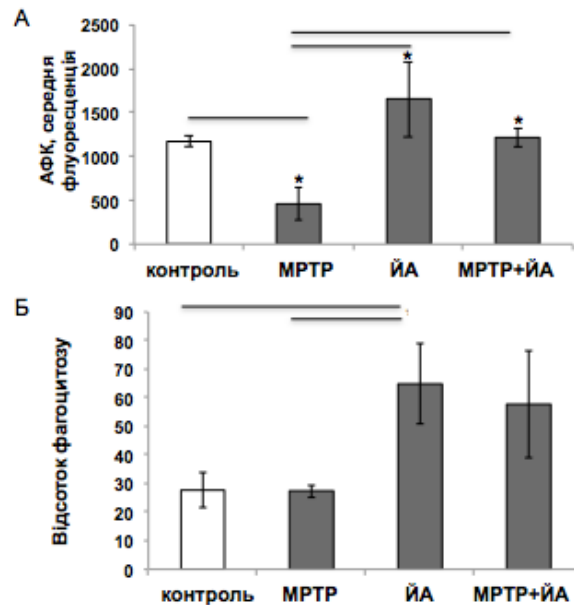


Рис. 6.6. Профіль периферичних моноцитів крові щурів, яким вводили фізіологічний розчин та/або МРТР на тлі експериментального коліту: А – продукція внутрішньоклітинних АФК; Б – відсоток фагоцитозу; $M \pm SD$, * - $p < 0,05$

Число CD69 позитивних моноцитів у щурів, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК не відрізнялося від контрольних значень (рис. 6.7, В), в той час, як інтенсивність поверхневої експресії CD69 була підвищеною в три рази ($p < 0,05$). Число CD69 позитивних моноцитів та інтенсивність поверхневої експресії CD69 були підвищеними у 1,8 ($p < 0,05$) та 6 разів ($p < 0,05$) відповідно у щурів, яким вводили МРТР на тлі експериментального ВК у порівнянні з контрольною групою, групою щурів, яким вводили МРТР та групою щурів, яким вводили фізіологічний розчин на тлі експериментального ВК (рис. 6.7, Г).

Також слід зазначити, що у щурів без коліту, яким вводили МРТР, поверхнева експресія CD69 на моноцитах була також підвищеною у 4 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 6.7, Г). За численними даними з досліджень по експериментальному ВК у CD69 дефіцитних мишей був показаний розвиток тяжкого ступеню ВК та підвищені рівні транскриптів до прозапальних цитокінів [155].

Надлишкова експресія CD69 індукувала продукцію толерогенних цитокінів та імуносупресивних клітин, які могли б пом'якшувати запалення у товстій кишці.

У нашому дослідженні рівень експресії CD69 був значно підвищений у щурів, яким вводили МРТР на тлі експериментального ВК, що могло свідчити про залучення CD69 позитивних клітин у лімітуванні кишкового запалення, що підтверджує роль негативного регулятора імунної відповіді у товстій кишці.

У той самий час число CD14 позитивних клітин було достовірно зниженим у щурів, яким вводили МРТР і щурів з експериментальним ВК, але не відрізнялося у щурів, яким вводили МРТР на тлі експериментального ВК (рис. 6.7, А). Цікаво, що поверхнева експресія CD14 була підвищеною у 2 рази ($p < 0,05$) у щурів без ВК, яким вводили МРТР, але була достовірно зниженою у 4 рази ($p < 0,05$) у щурів з ВК, яким вводили МРТР, і у 2,9 разів ($p < 0,05$) у щурів з ВК, яким вводили фізіологічний розчин (рис. 6.7, Б).

Враховуючи те, що CD14 є моноцит-специфічним маркером і число циркулюючих моноцитів може бути залежним від ступеню їх транслокації до запаленої тканини, отримані дані можуть свідчити про підвищення рівня тканинної транслокації моноцитів.

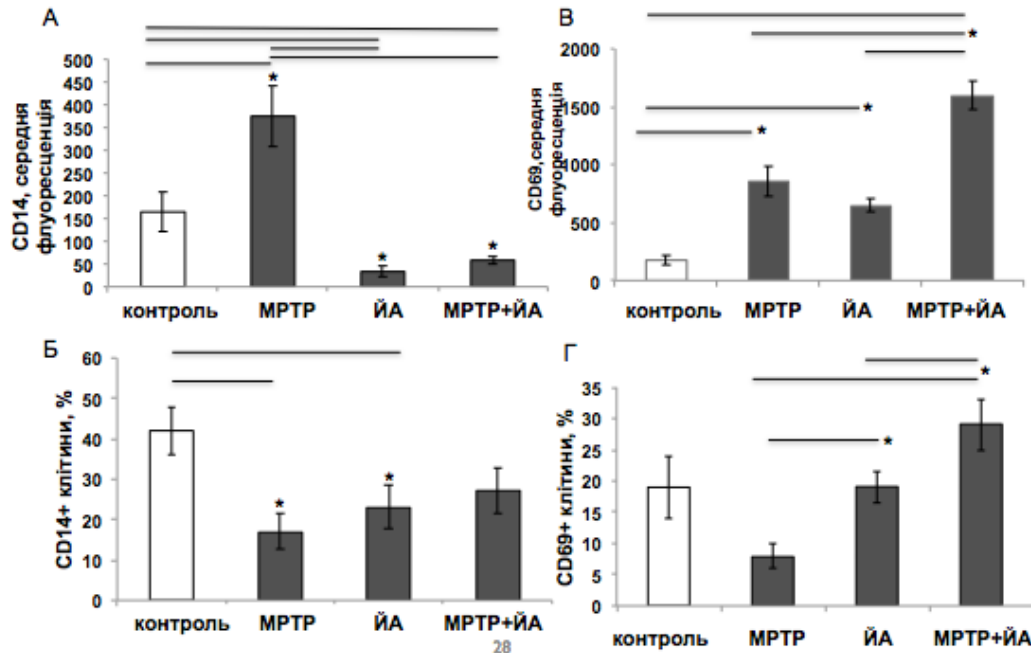


Рис. 6.7. Профіль периферичних моноцитів крові щурів, яким вводили фізіологічний розчин та/або МРТР на тлі експериментального коліту: А та Б - число CD14+ клітин та поверхнева експресія CD14 відповідно; В та Г – число CD69+ клітин та поверхнева експресія CD69 відповідно; $M \pm SD$, * - $p < 0,05$

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

Висновки до розділу:

1. За руйнування периферичних дофамінергічних нейронів відбувається покращення клінічних та макроскопічних ознак експериментального ВК.

2. Одним з можливих механізмів регулювання перебігу ВК може бути опосередкованим через регуляторний ефект дофамінергічної системи на фенотип моноцитів та їх респіраторну активність.

АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ

ЗЗК, а, саме, неспецифічний ВК та ХК – тяжкі хронічні запально – деструктивні захворювання нез'ясованої етіології, що виникають переважно в молодому віці, відзначаються тривалим перебігом, схильністю до частих рецидивів і тяжких ускладнень (як кишкових, так і позакишкових), а також високим рівнем інвалідизації [156]. Було встановлено, що хронічний перебіг ЗЗК підвищує ризик ректального канцерогенезу.

Поширеність ЗЗК в різних країнах широко варіює: частота ВК змінюється від 30 до 240 на 100 тис. населення, а ХК – від 10 до 150 на 100 тис. населення. Щорічний приріст ВК складає 5-30 випадків на 100 тис. населення, а ХК – 5-20 випадків на 100 тис. населення [54]. Більше, ніж 50% хворих знаходяться у працездатному віці, що робить ЗЗК соціально значимим захворюванням. За важкістю протікання та частотою ускладнень ЗЗК займають одне з провідних місць у світі [53].

Наразі причина виникнення ЗЗК є невизначеною. Пул експериментальних даних вказує на те, що ЗЗК можуть виникати внаслідок взаємодій між генами схильності до ЗЗК, мікробіомом, оточуючим середовищем та імунною системою, що можуть результувати надлишковою та аномальною імунною відповіддю мікробіоти носія у індивідумів з генетичною схильністю [157].

Найбільш описані на сьогоднішній день гени схильності до ЗЗК пов'язані з імунною системою носія, що включає функціонування епітеліального бар'єру, захисні механізми носія проти патогенів, а також аутофагію, вроджений та набутий імунітет [158]. ЗЗК характеризуються збільшенням продукції прозапальних цитокінів (TNF- α , інтерлейкінів (IL)-6, IL-13, IL-17,

IL-18 та IL-21) та зменшенням кількості протизапальних цитокінів (IL-10, IL-11 та трансформуючого фактору росту β) [148].

Сучасні терапевтичні підходи з застосуванням біологічної терапії (наприклад, інфліксимаб, ведолізумаб), по-перше, не призводять до тривалої ремісії, та, більше того, мають високу ціну і тому є недоступними для більшості українських пацієнтів.

Зважаючи на те, що перебіг даної хвороби має рецидивуючий характер, що обумовлює витрати держави на листки непрацездатності, а також те, що ЗЗК в ряді випадків стають причиною інвалідизації, пошук нових терапевтичних мішеней на основі більш глибокого розуміння патогенезу ЗЗК має не лише фундаментальне, але і важливе соціально-економічне значення.

Деякі автори наголошують на зв'язок дофамінергічної системи з розвитком ЗЗК. А саме, було показано, що у пацієнтів з паркінсонізмом, що характеризується гіподофамінергічною активністю, набуття ЗЗК було більш вірогідним, ніж у здорових індивідумів [147].

У той самий час є дані, згідно з якими було показано, що пацієнти з шизофренією, основною властивістю якої є гіпердофамінергічна активність, мали нижчу схильність до набуття ЗЗК [15].

Тому метою нашого дослідження було встановлення залучення власне дофамінергічної системи у патогенез ЗЗК, а також розмежування та встановлення ролі саме периферичної та центральної ланок дофамінергічної системи.

Розуміння ролі дофамінергічної системи в патогенезі ЗЗК та з'ясування можливих механізмів дії має важливе практичне значення для пошуку нових терапевтичних підходів для лікування хворих з ЗЗК з застосуванням препаратів з дофамінергічною активністю для корекції стану дофамінергічної системи.

З літературних джерел відомо, що близько 40% загального дофаміну має периферичне походження, включаючи ШКТ. Чисельні дослідження на симпатомованих тваринах показали присутність ТН на епітеліальних, м'язевих, ендотеліальних клітинах та лейкоцитах. Фармакологічні дослідження на нокаутуваних мишах також виявили існування периферичної дофамінергічної системи [159; 151; 160; 161].

Синтез дофаміну залежить від рівня перетворення амінокислоти тирозину за допомогою ТН у прекурсор дофаміну L-3,4-дигідроксифеніланін (L-DOPA) [135]. Визначення нейрональних ТН-позитивних клітин та рівня метаболіту дофаміну 3,4-дигідроксифенілоцтової кислоти (DOPAC) у дослідженнях на симпатомованих тваринах довели, що роль дофаміну на периферії знаходиться далеко за межами просто попередника синтезу адреналіну/норадреналіну.

У наших дослідженнях на моделі ЙА-викликаного ВК у щурів зниження рівня ТН у слизовій оболонці кишки було пов'язане з розвитком хвороби. Отже, зниження рівня дофаміну (а саме ТН, ферменту, лімітуючого синтез дофаміну) спостерігалось на фоні розвитку експериментального ВК у щурів.

В одному руслі з нашими результатами, Magro et al. [18] показали значно менший рівень дофаміну та відношення дофамін/L-DOPA у тканині (показник зниження декарбоксилазної активності L-амінокислоти) у запаленій слизовій оболонці пацієнтів з ХК та ВК. Нами показано, що разом з ТН, експресія ДАТ була також зниженою.

Розвиток запалення протягом експериментального ВК був пов'язаний зі значним зниженням рівня ДАТ, що може тягнути за собою зниження зворотнього захвату дофаміну з просвіту кишки та, як результат, дефіцит дофаміну протягом розвитку ЗЗК. Схоже падіння рівня ТН та ДАТ являє

собою збільшення синтезу дофаміну та його захвату, відповідно, тим самим, знижуючи тону дофамінергічної системи у СOTK під час розвитку ЗЗК.

Нами була показана широка розповсюдженість ДАТ у нормальній тканині товстої кишки, зокрема, на епітеліальних, ендотеліальних клітинах та ентеральних нейронах. Також деякими авторами була показана широка розповсюдженість дофамін-зв'язуючих ділянок у слизовій оболонці шлунка, дванадцятипалої кишки та м'язовому [160], у той час, як експресія ДАТ на епітеліальних клітинах шлунка, зокрема, паріетальних клітин, дванадцятипалої та товстої кишки була показана Mezey та співавт. та Tian та співавт.

Така розповсюдженість ДАТ вказує на значимість метаболітів їжі [151] та мікробіоти [161], як важливий ресурс ендогенного дофаміну. Розвиток запалення за умов ЙА-індукованого ВК був асоційований з достовірним зниженням ДАТ, що може спричиняти зниження захоплення люмінального дофаміну і, як результат, дефіцит дофаміну за розвитку ЗЗК. Даних щодо експресії ДАТ ендотеліальними клітинами не було показано, але з літературних джерел відомо про захоплення дофаміну та його метаболізм легневими ендотеліальними клітинами [162].

Свої ефекти дофамін опосередковує через 5 типів дофамінових рецепторів, які можуть бути згруповані у 2 родини: D1-подібні (D1, D5) та D2-подібні (D2, D3, D4) [33]. D1-D5-DR були знайдені по всій довжині ШКТ. Зокрема, у товстій кишці найбільш розповсюдженими є D2-подібні рецептори, а саме D2- та D3-DR.

Експресія D2-DR була виявлена на зрілих та клітинах-попередниках ендотеліальних клітин переважно у дистальному відділі товстої кишки [163]. У літературних джерелах було показано, що агоністи D2- та D3-DR здатні

пригнічувати дегрануляцію тучних клітин і продукцію про-запальних медіаторів *in vitro* [164].

Тому ми дослідили рівні протеїнів Д2- та Д3-ДР за ЙА-індукованого ВК у щурів, а також у пацієнтів з неспецифічним ВК.

Нами було встановлено, що Д2-ДР майже не експресувалися в неуразеній слизовій оболонці товстої кишки, але, на відміну від рівнів ТН та ДАТ, кишкові рівні Д2-ДР були достовірно підвищеними за ЙА-викликаного ВК.

Підвищення рівня протеїну Д2-ДР може бути компенсаторною реакцією на знижений дофамінергічний тон і вказує на важливість Д2-ДР у зворотній регуляції біосинтезу дофаміну та його зворотнє захоплення, що було показано раніше на моделях D2R-КО мишей [165] та підтверджено на моделі хвороби Паркінсона у щурів [166].

З іншого боку, підвищена експресія Д2-ДР, що має схожий профіль експресії на VEGFR2, була показана на шарі ендотеліальних клітин новоутворених кровоносних судин у мишей, яким вводили аденовірусний вектор (VEGF) [167], скоріше за все, завдяки підвищеним рівням VEGF. У нашому попередньому дослідженні [168], показано підвищення рівнів VEGF та VEGFR2 на двох моделях ЗЗК.

Також нами було вперше показано, що локалізація Д3-ДР відрізняється в нормі та на різних стадіях перебігу експериментального ВК. У контрольній групі спостерігалася переважно епітеліальна локалізація Д3-ДР, причому, вони були рівномірно розміщені по всій поверхні крипт (з основи до верхівки) на апікальних та базолатеральних мембранах епітеліоцитів та келихоподібних клітин.

У той самий час, на фоні 7 діб після введення ЙА спостерігалася помітне збільшення експресії Д3-ДР в м'язовій частині слизової оболонки товстої кишки та їх локалізація зсунулася ближче до верхівки крипт на апікальну

мембрану епітеліоцитів, а експресія ДЗ-ДР на келихоподібних клітинах помітно зменшилася.

За літературними даними, гени, що кодують ДЗ-ДР (як і інші рецептори даної групи, окрім Д4) виявлені по всій довжині травного тракту, починаючи від шлунка, закінчуючи товстою кишкою. При цьому, транскрипти до ДЗ-ДР знайдені в слизовій оболонці і в нервово-м'язовому плетиві [169]. Це вказує на те, що дофамін може опосередковувати свою дію через ДЗ-ДР у ШКТ. Але яку саме роль відіграє даний тип рецептора, залишається невідомим.

Зміна локалізації ДЗ-ДР на переважно епітеліальну на поверхні крипт на фоні розвитку запалення на фоні ЙА-викликаного ВК, вказує на можливу захисну роль даних рецепторів, що можуть діяти через регуляцію продукції слизу келихоподібними клітинами, на яких вони були знайдені у великій кількості.

В свою чергу, збільшення секреції слизу сприяє відновленню слизового бар'єру товстої кишки, що може запобігати загостренню рецидивам ВК, адже є одним з ключових факторів розвитку ЗЗК.

Нами було показано, що експресія ДЗ-ДР зменшувалась вже через 2 год після введення ЙА, досягала мінімальних значень через 6 год, підвищувалась через 3, 7 та 14 днів, але так і не досягала контрольних значень.

Як показано в наших попередніх дослідженнях, найбільших значень індексу активності хвороби досягає на 3-5 день після введення ЙА. При цьому, спостерігається збільшення експресії протеїну Д2-ДР, починаючи з 2 годин, після введення ЙА [170], що має протилежний ефект, порівняно зі зменшенням експресії протеїну ДЗ-ДР. Але, цікаво те, що Д2-ДР майже не експресувалися в неураженій СОТК, у той час, як ДЗ-ДР знайдені в значній кількості і в СОТК контрольної групи. Що разом з даними по експресії ДЗ-ДР,

вказує на різну роль ДР у функціонуванні слизової оболонки товстої кишки, а також, протіканні ЙА-викликаного ВК.

Для підтвердження результатів, отриманих на моделі експериментального ВК у щурів, ми проаналізували біопсійні зразки пацієнтів, хворих на неспецифічний ВК.

Здорова слизова оболонка характеризувалася значними рівнями протеїнів ДАТ, Д2-ДР, Д3-ДР та ТН, що знаходилися переважно на апікальній мембрані колоноцитів та базальній мембрані келихоподібних клітин. Запалена слизова оболонка пацієнтів з ВК характеризувалася зниженням рівня протеїнів Д2-ДР та Д3-ДР на 25%, а також зниженням рівня ТН на 75% переважно на колоноцитах. Рівень та локалізація ДАТ не булаи достовірно зниженими.

Отже, логічно припустити, що рецидиви хронічного ВК асоційовані зі зниженням синтезу дофаміну, а також зниженням рівнів протеїнів Д2-ДР, Д3-ДР слизової оболонки товстої кишки. Відновлення дофамінового сигналіngu може бути новим молекулярним механізмом у терапії ВК.

Отже, нами вперше встановлено порушення дофамінового сигналіngu в товстій кишці щурів в різні терміни ЙА-викликаного ВК та у пацієнтів з неспецифічним ВК.

Другим провідним патогенетичним фактором розвитку ВК є порушення кишкового бар'єру. Нормальне функціонування кишкового бар'єру знаходиться під контролем нейроендокринної системи, зв'язок товстої кишки і ЦНС забезпечується через автономну/вегетативну нервову систему та гіпоталамо-гіпофізарну надниркову дугу.

Вважається, що зовнішні фактори у вигляді психологічного стресу та негативних емоцій, можуть підвищувати проникність кишкового бар'єру і,

відповідно, загострювати протікання хвороби чи викликати рецидив через залучення центральних механізмів.

Відомо, що центральна дофамінергічна система також відіграє важливу роль в розвитку позитивних емоцій та адаптації до дії стресу.

Також відомо, що підвищена ендотеліальна проникність є основним фактором розвитку гострої запальної відповіді та сприяє її перетіканню у хронічну. У нашому дослідженні щури з ЙА-індукованим ВК мали у 1,4 рази вищу ендотеліальну проникність, ніж щури контрольної групи.

Отримані нами дані підтверджують попередні дослідження з підвищеної ендотеліальної проникності на тлі розвитку експериментального ВК [170].

З літературних джерел відомо, що активація периферичних дофамінергічних рецепторів пригнічує ендотеліальну проникність та справляє антизапальну дію.

А саме, на моделі синдрому гіперстимульованих яєчників лютеїнізуючих гранульозних клітин людини *in vitro* та *in vivo* було показано ефективність комерційно доступного агоністу Д2-ДР каберголіну, що попереджав підвищену ендотеліальну проникність через інгібування продукції та секреції VEGF. Окрім того, у малих дозах каберголін активував Д2-ДР та знижував VEGF-опосередковану ендотеліальну проникність, при цьому не порушуючи ангиогенез [171; 172].

Також ефективність агоністів Д2-ДР була показана для лікування раку легень, для якого використовували LLC1 модель раку легень у мишей. Пухлинний ангиогенез був інгібований агоністом Д2-ДР через нівелювання VEGFR2-опосередкованого сигналювання ендотеліальних клітин [173].

Враховуючи вищенаведене, другим етапом нашого дослідження було вивчення біохімічного механізму перебігу експериментального ВК, опосередкованого активацією Д2-ДР. У нашому дослідженні було підтверджено важливу роль дофамінового/Д2-ДР шляху у патогенезі ЗЗК. За

введення Д2-ДР квінпіролу у щурів достовірно знижувалися морфологічні ознаки ВК.

Активация Д2-ДР викликала зниження ендотеліальної проникності, що є головним фактором гострого запалення. Інгібування ендотеліальної проникності, індуковане Д2-ДР, було асоційованим зі зниженою активацією/фосфорилуванням c-Src та Akt, що опосередковують VEGF/VEGFR2-індуковану ендотеліальну проникність і активация яких була показана на гострій та хронічній моделях ЗЗК [174]. Подальші дослідження агоністів Д2-ДР необхідні для визначення їх ефективності за гострої та хронічної фаз ЗЗК.

У нашому дослідженні агоніст Д2-ДР не мав прямого ефекту на епітеліальну проникність, що підтверджує роль ендотеліального шару як первинного фактору відновлення кишкового бар'єру для успішного лікування ЗЗК [175]. Комерційно доступний агоніст Д2-ДР каберголін, у нашому дослідженні у малих дозах активував Д2-ДР і знижував VEGF-опосередковану ендотеліальну проникність без впливу на ангиогенез [176], покращував клінічні та морфологічні ознаки ЙА-викликаного ВК.

Rau та співавтори наголошували про важливість центрального дофаміну у підтриманні цілісності слизового бар'єру [177; 178]. Автори показали, що мікроін'єкція дофаміну або агоністу Д2-ДР бромокриптину в амігдалу змінювала стрес-індуковане утворення шлункових виразок у щурів у дозо-залежній манері.

Імунні клітини також являються додатковим до нервової системи джерелом дофаміну, експресія Д2-ДР була знайдена на CD4+ Т клітинах, В клітинах, натуральних кілерах, та, у меншій кількості, на нейтрофілах та дендритних клітинах [179; 180]. На прикладі досліджень на сплячих нормальних Т-клітинах людини було показано, що агоністи Д2-ДР можуть підвищувати експресію IL-10 [180].

Враховуючи те, що IL-10 є основним антизапальним цитокином у патогенезі ЗЗК, описаний позитивний ефект агоністу Д2-ДР також може бути

поясненим підсиленням експресії IL-10. Вищеописане вказує на можливу роль центрального дофаміну та регуляцію імунних клітин через D2-ДР у патогенезі ЗЗК.

Успішне лікування двох пацієнтів з ХК [181] та ВК [182] декстроамфетамін сульфатом, що діє через непряме вивільнення дофаміну та попереджає набряк [183], підтримує нашу думку про нову роль дофаміну у патогенезі ЗЗК.

Так як у нашому дослідженні були застосовані два D2-ДР агоністи – квімпірол та каберголін, обидва з яких можуть проходити крізь гематоенцефалічний бар'єр і впливати як на центральні, так і на периферичні дофамінергічні рецептори, ми не можемо виключити роль центральних D2-ДР у загоєнні кишкових уражень. Проте, питання про позитивний вплив центральних та/або периферичних дофамінергічних рецепторів на перебіг ВК залишається недостатньо вивченим.

Для розмежування ролі центральних та периферичних D2-ДР у зниженні ендотеліальної проникності товстої кишки щурів з експериментальним ВК, нами був застосований селективний антагоніст D2-ДР домперідон, який не проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр і тому діє лише на периферії [142]. Домперідон широко використовується для лікування гастропарезу, функціональної диспепсії, нудоти та педіатричного рефлюксу [143-146].

За попереднього введення лише домперідону ендотеліальна проникність товстої кишки достовірно знижувалася у щурів з експериментальним ВК у порівнянні з щурами, яким вводили фізіологічний розчин. Отримані дані можуть свідчити про те, що активація периферичних дофамінергічних нейронів може відігравати негативну роль у патогенезі ЗЗК через підвищення ендотеліальної проникності товстої кишки.

У попередніх дослідженнях позитивний вплив антагоністів D2-ДР був показаний на моделях виразкової хвороби шлунку. А саме, попереднє

введення різперидону, що є антагоністом D₂-ДР та 5-HT(2A) рецепторів, змінювало стрес-індуковану зміну гексозамінів, PGE(2) та ендотеліальну проникність [184]. Антипсихотик аріпіпразол, що також є антагоністом D₂-ДР, показав достовірну антивиразкову та гастропротективну активність на моделі етанол-індукованих шлункових виразок [185].

За сумісного введення квінпіролу та домперідону спостерігалось достовірне зниження ендотеліальної проникності товстої кишки майже у два рази у порівнянні з введення лише квінпіролу або лише домперідону. Отримані результати можуть свідчити про позитивний вплив центральної гілки дофамінергічної системи у попередженні розвитку та прогресуванні ЗЗК.

Наразі немає прямих доказів ролі центрального дофаміну у патогенезі ЗЗК, опосередкованими є дані про підвищені рівні прозапальних цитокінів товстої кишки та підвищеної кишкової проникності (які є головними ознаками патогенезу ЗЗК) у пацієнтів з хворобою Паркінсона [186; 187].

Отже, нами було вперше показано, що блокада периферичних D₂-ДР знижувала ендотеліальну проникність товстої кишки, а одночасні активація центральних D₂-ДР та інгібування периферичних D₂-ДР давали додатковий позитивний ефект у попередженні підвищеної ендотеліальної проникності товстої кишки на тлі експериментального ВК.

Іншим фактором підтримання цілісності кишкового бар'єру та його правильним функціонуванням є продукція слизу, який змащує стінки кишечника, тим самим запобігаючи інфільтрації мікроорганізмів у стінку кишечника і розвитку запальної реакції. Слиз продукується і вивільнюється келихоподібними клітинами.

Відомо, що продукція слизу та заживлення слизового шару є основними факторами патогенезу ЗЗК [188]. Зазвичай ці зміни супроводжуються

заживленням ерозій та виразок, що підтверджуються ендоскопічно [189]. Заживлення слизового шару асоційоване з кращим контролем хвороби, безстероїдної ремісії, зниженням рівнів госпіталізації та випадків оперативних втручань, що значно покращує рівень життя пацієнтів. Переховані вище фактори наголошують на важливості заживлення слизового шару.

За умов ЙА-викликаного ВК зростання кількості загальних глікопротеїнів поверхневого слизу збігається у часі зі стрибкоподібним падінням вмісту фукози та зростанням кількості сіалових кислот у складі вуглеводних ланцюгів муцинів. Це вказує на активацію процесів секреції муцинів із менш розгалуженою вуглеводною частиною.

Не зважаючи на зростання загальної кількості муцинів та значне подовження вуглеводних ланцюгів за рахунок зростання рівня гексоз, такий слиз стає менш щільним і за рахунок низького ступеня розгалуженості, ймовірно, гірше утримується на поверхні епітеліальних клітин [190]. Крім цього, зменшення кількості бічних вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів збільшує доступність епітелію для мікроорганізмів та чужорідних макромолекул, що, в свою чергу, підтримує перебіг запального процесу [150].

У наших дослідженнях було встановлено вірогідне зростання загальної кількості глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів починаючи з 6-ї год після індукування ВК, яке трималось на плато на 3-й та 7-й день експерименту. Це свідчить про активацію келихоподібних клітин слизової оболонки товстої кишки, які в нормі секретують слиз у відповідь на появу хвороботворного чинника. Оскільки муцини є основною складовою поверхневого слизу [63], можна говорити про зростання загальної кількості слизу товстої кишки щурів на тлі ЙА-індукованого ВК на стадіях хронічного перебігу хвороби.

З метою дослідження якісного складу глікопротеїнової частини слизу, зокрема структури гліканів, що відповідають за в'язкість слизу, ми вивчали кількість гексоз, гексозамінів, фукоз та сіалових кислот у складі слизу.

Кількісне визначення вмісту гексоз вказує на значне підвищення кількості цих сполук на 3-й та на 7-й день після індукування експериментального ВК порівняно з контролем. Навпаки, вміст фукози у складі поверхневого слизу товстої кишки щурів різко знижувався через 6 год.

Спостереження у більш віддалені терміни ВК (хронізація процесу запалення) виявило подальше зменшення кількості фукоз у складі слизу. Так, на 3-й день після початку експерименту їх кількість була значно зменшена. Визначення вмісту гексозамінів поверхневого слизу щурів виявляє поступове зростання рівня цих сполук у складі поверхневого слизу товстої кишки щурів. Вже через 0,5 год після індукування експериментального ВК показано збільшення кількості гексозамінів порівняно з контрольною групою. Надалі тенденція зберігається і спостерігається зростання вмісту гексозамінів через 2 год, через 6 год та на 3-й та на 7-й день від початку експерименту порівняно з відповідними показниками у контрольних тварин.

Крім цього, показано зростання вмісту сіалових кислот на 7-й день після початку експерименту порівняно з контролем. Зростання кількості загальних глікопротеїнів поверхневого слизу збігається у часі зі стрибкоподібним падінням вмісту фукози та зростанням кількості сіалових кислот у складі вуглеводних ланцюгів муцинів. Це вказує на активацію процесів секреції муцинів із менш розгалуженою вуглеводною частиною.

Товста кишка людини колонізована великою кількістю симбіотичних бактерій. Більшість мікроорганізмів живе у зовнішньому, менш щільному слизовому шарі, тоді як внутрішній, щільний слизовий шар виконує функцію бар'єру, що запобігає безпосередньому контакту бактерій з епітелієм [191]. За відсутності чи при зміні структури слизового шару, прямий контакт бактерій з епітелієм товстої кишки сприяє розвитку запалення [192].

Згідно з численними генетичними дослідженнями, гени, які залучені в каскади глікозилування, визначені як локуси сприйнятливості до ЗЗК. Наприклад, FUT2 (що кодує глікозилтрансферазу, яка додає фукозу до глікопротеїнів) та HNF4A (що кодує транскрипційний фактор, який регулює синтез ГДФ-глюкози та змінює експресію деяких фукозилтрансфераз) [193] були асоційовані з ВК [194] та ХК [195].

Фукозилтрансферази (FUT1 та FUT2) відповідають за синтез групових антигенів крові системи АВО (Н антиген синтезується продуктом FUT2 і далі модифікується іншими глікозилтрансферазами для подальшого формування антигенів А та В) [196]. Фукозилзовані групові антигени крові беруть участь у взаємодіях «носій–мікробіом»; на мишах, нокаутованих за експресією генів фукозилзованих гліканів (FX-/-) був показаний розвиток ВК [196; 197].

Крім цього, п'ять з 16 ідентифікованих генів, що регулюють глікозилування IgG, асоційовані з ЗЗК (IKZF1, LAMB1, MGAT3, IL6ST та VACH2) [198]. Беручи до уваги ці генетичні докази, а також суттєві ефекти альтернативного глікозилування імуноглобулінів на імунні функції [199], подальші дослідження глікозилування в контексті ЗЗК є необхідними.

З іншого боку, склад мікробіоти товстої кишки впливає на склад вуглеводної частини глікопротеїнів слизу. Зокрема було показано, що змінена ензиматична активність кишкової мікробіоти може вказувати на адаптацію кишкових бактерій до складу слизу в нормі та при патології [200].

Враховуючи те, що порушення складу мікробіоти і надмірна реакція імунної системи хазяїна на ці зміни – є характерною ознакою ЗЗК [201], ми не можемо виключати роль мікробіоти у визначених нами показниках структурних змін вуглеводної частини глікопротеїнів слизу.

Враховуючи вищенаведене, наступним етапом наших досліджень було з'ясування ролі та можливого механізму дії ДЗ-ДР в патогенезі експериментального ВК. ДЗ-ДР були знайдені нами у великій кількості на келихоподібних клітинах товстої кишки щурів. Для дослідження ролі

периферичних ДЗ-ДР ми застосували селективний агоніст ДЗ-ДР 7-ОН-ДРАТ, який, на відміну від дофаміну, може проходити крізь гематоенцефалічний бар'єр.

Раніше протективний ефект 7-ОН-ДРАТ у дозі 0,1 мг/100 г (п.ш.) був показаний на моделі стрес-індукованих шлункових уражень [202]. У нашому дослідженні 7-ОН-ДРАТ був застосований у двох дозах, які мали різний вплив на клінічні та макроскопічні показники протікання експериментального ВК. У дозі 0,02 мг/100 г (п.ш.) 7-ОН-ДРАТ достовірно покращував клінічні показники стану товстої кишки за експериментального ВК, в той час, як у дозі 0,1 мг/100 г (п.ш.) було помічене погіршення клінічних показників стану товстої кишки на тлі експериментального ВК.

Отримані результати підтверджувалися гістологічним аналізом, а саме нормалізація структури крипт, слизового шару та зниження кількості макрофагів спостерігалися у групі, якій вводили 7-ОН-ДРАТ у порівнянні з контрольною групою.

Келихоподібні клітини знаходяться у великій кількості у криптах слизової оболонки товстої кишки і виділяють слиз. Муцини, що продукуються келихоподібними клітинами, запобігають бактеріальній транслокації з подальшою активацією імунних клітин. Відомо, що деякі муцини, а саме муцин-3 (MUC-3) сприяє заживленню уражень.

Раніше було показано, що у деяких клітинних лініях людини бета-дефензин 2 стимулював продукцію слизу, особливо, муцину-2 та муцину-3 і запобігав TNF-опосередкованому апоптозу епітеліальних клітин товстої кишки. Це може свідчити про протективну роль дефензинів у заживленні експериментальних ерозій та відновленні епітелію. Ці дані збігаються з нашими даними і можуть вказувати на те, що підвищена продукція слизу у

щурів, яким вводили 7-ОН-ДРАТ після індукування експериментального ВК, є протективним механізмом попередження ЗЗК.

Узагальнюючи вищенаведене, введення 7-ОН-ДРАТ призводило до збільшення концентрації загальних глікопротеїнів та гексоз, що свідчить про залучення ДЗ-ДР в механізм секреції слизу. Встановлено, що ефект активації ДЗ-ДР на продукцію поверхневого слизу не пов'язаний зі збільшенням секреторної функції келихоподібних клітин, адже їх площа перерізу зменшувалася за умов введення агоністу. Це може бути пов'язаним з виснаженням келихоподібних клітин внаслідок вивільнення слизу.

Відомо, що макрофаги відіграють важливу роль у захисті внутрішнього середовища організму. Показано, що активація ДЗ-ДР введенням 7-ОН-ДРАТ призводила до підвищення функціонального резерву макрофагів до повторної імунної відповіді на дію подразника за умов ВК. Враховуючи те, що ДЗ-ДР локалізовані на клітинах імунного захисту, ми припустили, що позитивний ефект 7-ОН-ДРАТ пов'язаний з впливом даного агоністу на первинну імунну відповідь.

Тучні клітини є високоспеціалізованими імунними клітинами сполучної тканини хребетних тварин, які приймають участь в адаптивному імунитеті і відіграють важливу роль у запальних реакціях. Показано, що за введення 7-ОН-ДРАТ збільшувався функціональний резерв макрофагів та тучних клітин.

Отже, в основі біохімічних механізмів покращення перебігу експериментального ВК за активації ДЗ-ДР лежить вплив на продукцію слизу та підвищення функціонального резерву перитонеальних макрофагів та тучних клітин.

Загалом, отримані нами результати підтверджують негативну роль саме периферичної дофамінергічної системи, що може бути скоригованою агоністами до ДР, а саме ДЗ-ДР через збільшення продукції слизу та заживлення кишкового бар'єру і є перспективним для лікування ЗЗК у клініці.

Враховуючи той факт, що в основі патогенезу ЗЗК лежить порушення імунної відповіді на нормобіоту, ми перевірили вплив периферичної дофамінергічної системи на біохімічні та імунологічні показники крові щурів з експериментальним ВК.

Так як ДР, а також ферменти, відповідальні за синтез та розщеплення дофаміну, а також ДАТ знаходяться, як у центрі, так і на периферії, нами була поставлена задача розмежувати вплив центральної та периферичної ланок дофамінергічної системи.

Також суттєвим аргументом є наукові праці останніх років, що вказують на взаємозв'язок запалення товстої кишки та розвиток нейродегенеративних захворювань, а саме хвороби Паркінсона. Однак, наразі є невідомим, що передує – запалення в товстій кишці чи порушення структури та функцій головного мозку внаслідок руйнування дофамінергічних нейронів при хворобі Паркінсона.

Для підтвердження руйнування периферичних дофамінергічних нейронів ми перевірили рівні ТН в товстій кишці та середньому мозку після введення МРТР.

Наразі такі моделі, як МРТР, 6-OHDA та ротенонова є класичними експериментальними моделями паркінсонізму на тваринах, який, як відомо, характеризується руйнуванням дофамінергічних нейронів.

Нами було застосовано саме модель руйнування периферичних дофамінергічних нейронів шляхом введення нейротоксину МРТР (4X, 20 мг/кг, п/ш), тому що згідно з літературними даними, у цій дозі МРТР не викликає значних порушень кількості центральних дофамінергічних нейронів [203], але достовірно знижує число ентеральних ТН-позитивних нейронів, а також концентрацію дофаміну товстої кишки, шлунку та стравоходу [204].

Нами було показано, що рівень TH був знижений у товстій кишці, в той час, як у мозку рівень TH залишався незмінним за введення МРТР. Це підтверджує руйнування лише периферичних дофамінергічних нейронів.

Відомо, що за хвороби Паркінсона руйнуються не лише дофамінергічні, а й норадренергічні нейрони. А саме, коли більшість дофамінергічних нейронів зруйнована, включаються компенсаторні механізми підтримання рівня TH, опосередковані норадренергічними нейронами. Це також допомагає знижувати прогресування хвороби, спричинене падінням рівня дофаміну в мозку; з часом норадренергічні нейрони також руйнуються [205].

Важливо зауважити, що за руйнування периферичних дофамінергічних нейронів ми спостерігали значне покращення як клінічних, так і мікроскопічних показників перебігу ВК.

На фоні введення МРТР або фізіологічного розчину у щурів без ВК не спостерігалася зміна клінічних та макроскопічних показників. Отже, руйнування дофамінергічних нейронів на периферії призводило до покращення морфологічних ознак ВК у щурів. Погіршення клінічних проявів коліту (летаргії, діареї, втрати маси тіла) у щурів за введення МРТР дає змогу спекулювати позитивною роллю центральної дофамінергічної системи в патогенезі ЗЗК. Для підтвердження даного припущення необхідні подальші дослідження.

На сьогоднішній день причина ЗЗК є нез'ясованою, однак дані літературних джерел вказують на те, що ЗЗК виникають як наслідок взаємодії між генами схильності, мікробіомом, навколишнім оточенням та імунною системою, що може спричинити надлишкову та аномальну імунну відповідь проти власного мікробіому носія у генетично схильних індивідумів [206].

Найбільш описані гени схильності до ЗЗК пов'язані з імунною системою носія, що включають функцію епітеліального бар'єру, захисні механізми носія

проти патогенів, також аутофагія, вроджена та набута імунна відповідь [207]. ЗЗК характеризуються підвищенням прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-6, IL-13, IL-17, IL-18 та IL-21) та зниженням антизапальних цитокінів (IL-10, IL-11, TGF- β) [208].

Дофамін є основним трансмітером між нервовою та імунною системами, адже він продукується власне імунними клітинами [49]. Декількома авторами було показано наявність D1-ДР, D2-ДР, D3-ДР, D4-ДР та D5-ДР на лейкоцитах людини. Також відомо, Т-лімфоцити та моноцити мають низький рівень експресії ДР, нейтрофіли, еозинофіли мають середній рівень, а В-лімфоцити та натуральні кілери мають високий рівень експресії ДР. Також, D1-ДР були виявлені на дендритних клітинах і система зворотного захоплення дофаміну була ідентифікована на лімфоцитах [209].

Інфільтруючі нейтрофіли є першою лінією захисту носія проти числених інфекційних патогенів, що опосередковують свій вплив через секрецію цитокінів, протеаз, генерацію АФК і формування позаклітинних пасток нейтрофілів [210].

Функціональні дослідження, проведені в умовах *in vitro*, вказують на інгібуючий ефект дофаміну на fMLP-стимульовану продукцію супероксид-аніону нейтрофілами людини [211]. Дофамін може змінювати експресію Cd11b/CD18 нейтрофілів, що характеризується зниженою можливістю адгезії до ендотелію нейтрофілами людини, а також зниженням продукції АФК та супероксид-аніону, клітинної міграції та активності фагоцитозу [154].

У нашому дослідженні рівні МПО кишкового слизу, що є класичним маркером інфільтрації нейтрофілів, не відрізняли у щурів, яким вводили МРТР та у щурів, яким вводили фізіологічний розчин за умов ЙА-індукованого ВК. У периферичній крові щурів за введення МРТР або фізіологічного розчину, розвиток ВК був асоційованим з достовірним

підвищенням фагоцитуючих гранулоцитів (в основному нейтрофілів) та респіраторним вибухом гранулоцитів у порівнянні з групою щурів без ВК. У щурів без ВК за введення МРТР число гранулоцитів у фагоцитозі було достовірно зниженим.

Для аналізу профілю гранулоцитів ми перевірили число CD69 позитивних гранулоцитів та інтенсивність поверхневої експресії CD69. CD69 є раннім маркером активації антигену на Т і В клітинах, що також експресується на активованих макрофагах та нейтрофілах. Було показано, що миші, дефіцитні по CD69, набували менш вираженого запалення та ураження печінки, індуковане блеоміцином, ніж миші дикого типу [212]. У нашому дослідженні число CD69 позитивних гранулоцитів та інтенсивність поверхневої експресії CD69 були достовірно вищими у груп щурів, яким вводили МРТР або фізіологічний розчин за умов ВК, ніж у контрольних щурів. Інтенсивність поверхневої експресії CD69 була також підвищеною у щурів без ВК за введення МРТР.

CD14 є найважливішим корецептором ендотоксину на фагоцитуючих клітинах. В нашому дослідженні руйнування периферичної дофамінергічної системи у щурів за введення МРТР було пов'язане з достовірним зниженням числа CD14 позитивних гранулоцитів та інтенсивності поверхневої експресії CD14 у порівнянні з контрольними тваринами. Також, ці параметри були достовірно зниженими у щурів, яким вводили МРТР за умов ВК у порівнянні зі щурами, яким вводили фізіологічний розчин на тлі ВК.

Моноцити та макрофаги разом з дендритними клітинами представляють мононуклеарну систему фагоцитів, яка відіграє важливе значення у підтримці цілісності тканин. Мононуклеарні фагоцити є критичними для відновлення тканин після пошкоджень, а також для ініціації та підтримки вродженої та набутої імунної відповіді [208].

Дофамін та дофамінергічні агенти можуть впливати на деякі функції моноцитів, наприклад, дофамін здатний знижувати LPS-індуковану проліферацію моноцитів людини [213]. Було показано, що на моделі LPS-стимульованих макрофагів кісткової тканини запальний процес супресується дією дофаміну на Д1-ДР через інгібування інфламосоми NLRP3, що є цитозольним протейновим комплексом, який індукує запалення у відповідь на бактеріальні патогени. Окрім цього, дофамін через свій вплив на Д1Р може попереджати системне та нейрозапалення *in vivo* [214].

Нами було показано, що руйнування периферичної дофамінергічної системи щурів за введення МРТР було асоційоване зі зниженням продукції АФК циркулюючими моноцитами, в той час, як активність фагоцитозу та число фагоцитуючих моноцитів були незмінними у порівнянні з контрольними тваринами. Продукція АФК циркулюючими моноцитами була зниженою у щурів за введення МРТР або фізіологічного розчину за умов ЙА-викликаного ВК, але цей параметр не сягав статистичної значимості. Ці дані вказують на антизапальний профіль моноцитів, що може свідчити про менш виражені коліт-асоційовані кишкові ураження у щурів за введення МРТР у порівнянні зі щурами, яким вводили фізіологічний розчин.

Число CD69 позитивних моноцитів у щурів, яким вводили МРТР за умов ВК не відрізнялося від контрольної групи, але інтенсивність поверхневої експресії CD69 була достовірно підвищеною. Число CD69 позитивних моноцитів та інтенсивність поверхневої експресії CD69 були у 1,8 разів та 6 разів підвищені, відповідно, у щурів за введення МРТР за умов ВК у порівнянні з контрольною групою, щурами, яким вводили МРТР без ВК, та щурами, яким вводили фізіологічний розчин за умов ВК.

За введення МРТР група щурів без ВК також мала підвищену інтенсивність поверхневої експресії CD69 на моноцитах порівняно з

контрольною групою. Численні дослідження на CD69-дефіцитних мишах показали розвиток важкого ВК з підвищеними рівнями транскриптів до прозапальних цитокінів [214]. Надлишкова експресія CD69 сприяє продукції толерогенних цитокінів та імуносупресивних клітин, що може впливати на запалення у товстій кишці.

У нашому дослідженні експресія CD69 була достовірно вищою у щурів при введенні МРТР за умов ВК, що і може свідчити про залучення CD69+ клітин в обмеженні кишкового запалення, що вказує на важливу роль CD69 як негативного регулятора імунної відповіді в товстій кишці.

У той самий час число CD14 позитивних клітин було достовірно зниженим у щурів за введення МРТР, а також у щурів з ВК. Цікаво те, що поверхнева експресія CD14 була у два рази підвищеною у щурів за введення МРТР без ВК, але була достовірно зниженою у щурів, яким вводили фізіологічний розчин та у щурів, яким вводили МРТР, за умов ВК. Враховуючи те, що CD14 є моноцит-специфічним маркером і число циркулюючих моноцитів може залежати від ступеню їх транслокації до запалених тканин, вищезазначені зміни можуть свідчити про підвищений ступінь транслокації моноцитів у тканини.

Нами було вперше показано, що руйнування периферичних дофамінергічних нейронів призводить до покращення морфологічних ознак експериментального ВК у щурів. Одним з можливих механізмів регулювання перебігу коліту може бути регуляторний ефект дофамінергічного сигналіngu на фенотип моноцитів та їх респіраторну активність.

ВИСНОВКИ

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

1. Доведено, що за ЙА-індукованого ВК в слизовій оболонці товстої кишки щурів спостерігалось зниження рівня протеїнів ТН, MAO-B та ДАТ, що може свідчити про порушення метаболізму дофаміну в СОТК за умов запалення. Крім того, показано зміни рівня протеїну Д2-ДР в залежності від стадії перебігу експериментального ВК. Встановлено, що в нормі Д3-ДР локалізуються на ендо- та епітеліальних клітинах і ентеральних нейронах товстої кишки. При експериментальному ВК локалізації даних рецепторів була переважно епітеліальною, а їх рівень значно знижений.

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

3. Активація Д2-ДР селективними агоністами квінпіролом та каберголіном мала антивиразковий та антизапальний ефект за умов ЙА-викликаного коліту у щурів. Цей ефект не пов'язаний зі змінами епітеліальної проникності СОТК щурів. Проте активація Д2-ДР призводила до пригнічення екстравазації альбуміну з кровоносних судин СОТК щурів, що свідчить про

зменшення ендотеліальної проникності і, відповідно, запалення при ЙА-викликаному ВК. Позитивний ефект Д2-ДР на ендотеліальну проникність пов'язаний з переважанням активації центральних над периферичними Д2-ДР. В механізмі Д2-ДР-опосередкованого впливу на ендотеліальну проникність СОТК щурів за ЙА-викликаного ВК залучені Src- та Akt-протеїнкінази.

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

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kobayashi K. Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: mouse molecular genetic study. *J Investig Dermatol Proc.* 2001; 6(1):115-121.
2. van den Brink WJ, Palic S, Köhler I, de Lange ECM. Access to the CNS: biomarker strategies for dopaminergic treatments. *Pharmaceutical research.* 2018; 35(3): 64.
3. Eisenhofer G, Aneman A, Friberg P, Hooper D, Fändriks L, Lonroth H, Hunyady B, Mezey E. Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *J Clin endocrinol Metab.* 1997; 82(11): 3864-3871.
4. Eaker EY, Bixler GB, Dunn AJ, Moreshead WV, Mathias JR. Dopamine and norepinephrine in the gastrointestinal tract of mice and the effects of neurotoxins. *J Pharmacol exp Ther.* 1988; 244(2): 438-442.
5. Lyte M. "Microbial endocrinology and the microbiota-gut-brain axis." *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease.* Springer, New York, NY, 2014: 3-24.
6. Lyte M, John F. Cryan, eds. *Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease.* Vol. 817. New York: Springer, 2014.
7. Basu S, Sarkar C, Chakroborty D, Nagy J, Mitra RB, Dasgupta PS, Mukhopadhyay D. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer research.* 2004; 64(16): 5551-5555.
8. Chakroborty D, Sarkar C, Yu H, Wang J, Liu Z, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine stabilizes tumor blood vessels by up-regulating angiopoietin 1 expression in pericytes and Krüppel-like factor-2 expression in tumor

endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(51): 20730-20735.

9. Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Kramer AF. Neurobiology of exercise. *Obesity*. 2006; 14(3): 345-356.

10. Pacheco R, Contreras F, Zouali M. The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*. 2014; 5(117): 1-17.

11. Mackie P, Lebowitz J, Saadatpour L, Nickoloff E, Gaskill P, Khoshbouei H. The dopamine transporter: an unrecognized nexus for dysfunctional peripheral immunity and signaling in Parkinson Disease. *Brain, behavior, and immunity*. 2018

12. Neurath MF. Current and emerging therapeutic targets for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 14(5): 269.

13. Strang R. The association of gastro-duodenal ulceration and Parkinson's disease. *Med J Austral*. 1965; 1:842-843.

14. Szabo S: Dopamine disorder in duodenal ulceration. *Lancet*. 1979; 2:880-882.

15. Szabo S, Tolstanova G. New molecules as drug candidates for the treatment of upper and lower GI tract ulcers. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(21): 2993-3001.

16. Xuan Zhang MM, Xiaoying Jiang. Effects of enteral nutrition on the barrier function of the intestinal mucosa and dopamine receptor expression in rats with traumatic brain injury. *J of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2015; 39 (1): 114-123.

17. Magro F, Vieira-Coelho MA, Fraga S, Serrão MP, Veloso FT, Ribeiro T, Soares-da-Silva P. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 2002; 47(1): 216-224.

18. Magro F, Araujo F, Pereira P, Meireles E, Diniz-Ribeiro M, Velosom FT. Soluble selectins, sICAM, sVCAM, and angiogenic proteins in different activity groups of patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 2004; 49(7-8): 1265-1274.
19. Magro F, Costa C. Long-standing remission of Crohn's disease under imatinib therapy in a patient with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006; 12(11): 1087-1089.
20. Никишина ЮО. Роль дофамина мозгового происхождения в эндокринной регуляции функций в развивающемся организме: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.03.01. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук. Москва; 2015.
21. Gerbi A, Maixent JM, Zearouga M, Berrebi-Bertrand I, Debray M, Chanez C, Bporre JM. Specific modulation of two neuronal digitalis receptors by anaesthesia. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 1997; 17(6): 137-147.
22. Koslow SH. Dopamine and other catecholamine-containing SIF cells. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1977; 16(22): 553-556.
23. Chritton SL, Chinnow SL, Grabau C, Dousa MK, Lucas D, Roddy D, Tyce GM. Adrenomedullary secretion of DOPA, catecholamines, catechol metabolites, and neuropeptides. *J Neurochem.* 1997; 69(18): 2413-2420.
24. Хухо Ф. Нейрохимия. *Основы и принципы*. М: Мир; 1990.
25. Willemsen MA, Verbeek MM, Kamsteeg EJ, de Rijk-van Andel JF, Aeby A, Blau N, Hauessler M. Tyrosine hydroxylase deficiency: a treatable disorder of brain catecholamine biosynthesis. *Brain.* 2010; 133(6): 1810-1822.
26. Spielwoy C, Roubert C, Hamon M, Nosten M, Betancur C, Giros B. Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behavioural pharmacology.* 2000; 11(3-4): 279.

27. Walker JK, Gainetdinov RR, Mangel AW, Caron MG, Shetzline MA. Mice lacking the dopamine transporter display altered regulation of distal colonic motility. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000; 279(2): G311-G318.
28. Kurian MA. Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *The Lancet Neurology*. 2011; 10(1): 54-62.
29. August JT, Murad F, Anders MW, Coyle JT, Goldstein DS, Eisenhofer G, McCarty R. Catecholamines bridging basic science with clinical medicine. Academic. Press; 1998; 273-292.
30. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. *British J. of Pharmacol*. 2004; 172(1): 1-23.
31. Bellucci A. Alpha-synuclein aggregation and cell death triggered by energy deprivation and dopamine overload are counteracted by D2/D3 receptor activation. *J Neurochem*. 2008; 352(106): 560-577.
32. Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci*. 2001; 2(4): 274-286.
33. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Reviews*. 2011; 63(1): 182–217.
34. Missale CM. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev*. 1998; 78(1): 189-225.
35. Fiorentini C. The D3 dopamine receptor: From structural interactions to function. *Europ. Neuropsychopharmacol*. 2014; 81(22): 1869-1888.
36. Rondou P, Haegeman K, Van Craenenbroeck. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci*. 2010; 67(12): 1971-1986.

37. Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology*. 2007; 69(20): 1953-1957.
38. Vieira-Coelho M, Soares-da-Silva P. Dopamine formation, from its immediate precursor 3,4-dihydroxyphenylalanine, along the rat digestive tract. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1993; 7(5): 235-243.
39. Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD. Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D2 Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(10): 2798–2807.
40. Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katrich V. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science*. 2010; 330(6007): 1091-1095.
41. Mittal R, Debs LH, Patel AP, Nguyen D. Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut-brain axis. *J. of Cellular Physiol.* 2016; 115(18): 258 – 285.
42. Valatas V., Bamias G, Kolios G. Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. *Eur. J. Pharmacol.* 2015; 759(7): 253-264.
43. Sarkar C, Chakroborty D, Mitra RB. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2004; 287(4): 1554-1560.
44. Sarkar C, Chakroborty D, Chowdhury UR. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(8): 2502- 2510.

45. Magro F, Fraga S, Ribeiro T. Decreased availability of intestinal dopamine in transmural colitis may relate to inhibitory effects of interferon-gamma upon L-DOPA uptake. *Acta. Physiol. Scand.* 2004; 180(4): 379-386.
46. Magro F, Cunha E, Araujo F. Dopamine D2 receptor polymorphisms in inflammatory bowel disease and the refractory response to treatment. *Dig. Dis. Sci.* 2006; 51(11): 2039-2044.
47. Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature medicine.* 2001; 7(5): 569-574.
48. Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2011; 96(8): 2484-2492.
49. Sarkar C. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain. Behav. Immun.* 2010; 24(4): 525-528.
50. Pacheco R, Prado CE, Barrientos MJ, Bernales S. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* 2009;. 216(1-2): 8-19.
51. Franco R, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O'Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* 2007; 28:400–710.
52. Glavin GB. Activity of selective dopamine DA, and DA,agonists and antagonists on experimental gastric lesions and gastric acid secretion. *Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 251(2): 726-730.
53. Крилова ОО. Неспецифічний виразковий коліт та хвороба Крона. Питання діагностики та лікування. *Здоров'я України.* 2007;. 7(1): 8.
54. Белоусова Е. А. Язвенный колит и болезнь Крона. Тверь: Триада; 2002: Т. 3.

55. Філіппов ЮО, Шмігель ЗМ, Котельникова ГП. Рівень поширеності і захворюваності на хвороби органів травлення в Україні серед дорослих людей та підлітків. *Гастроентерологія*. 2001; 32: 3-6.
56. Abreu MT, Sparrow MP. Translational research in inflammatory bowel disease. *The Mount Sinai journal of medicine*. 2006; 73(8): 1067-1073.
57. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит. М : Гэотар-мед; 2001.
58. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411(6837): 599-603.
59. Dobrowolska-Zachwieja A, Linke K, Jakubowska-Burek L, Kucharski M. Genetic background of inflammatory bowel disease. *Gastroenterologia Polska/Gastroenterology*. 2009; 16(6).
60. Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*. 2015; 3(1-2): 317-325.
61. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis*. 2009; 15(1): 100-113.
62. McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. 2011; 9(4): 265-278.
63. Boltin D, Perets TT, Vilkin A, Niv Y. Mucin function in inflammatory bowel disease, an update. *J. Clin. Gastroenterol*. 2013; 47(2): 106-111.
64. Holm'en Larsson JM, Karlsson H, Sjovall H. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology*. 2009; 19(7): 756-766.
65. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006; 1765(2): 189-222.

66. Bergstrom KS, Kisson-Singh V, Gibson DL, Ma C, Montero M. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS. Pathog.* 2010; 6(5): 131-155.
67. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 2008; 70(5): 459-486.
68. JrChidlow JH, Langston W, Greer JJM. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am. J. Pathol.* 2006; 169: 2014-2030.
69. Danese S, Sans M, de la Motte C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 2006; 130(7): 2060-2073.
70. JrChidlow JH, Shukla D, Grisham MB. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am. J. Physiol. Gastrointest.Liver. Physiol.* 2007; 293: G5-G18.
71. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003; 9(6): 653-60.
72. Khachigian LM. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ. Res.* 2006; 98(2): 186-91.
73. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junction. *Cell Mol Life Sci.* 2013; 70(4): 631-59.
74. Khalili A, Ebrahimpour S, Maleki I, Abediankenari S, Mohammadnia Afrouzi M. CD4+CD25+CD127low FoxP3+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Rom J Intern Med.* 2018.
75. Langenhorst D, Tabares P, Gulde T. Inactivation of TRPM7 kinase in mice results in enlarged spleens, reduced T-cell proliferation and diminished store-operated calcium entry. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 3023.

76. Pieper J, Herrath J, Raghavan S, Muhammad K, van Vollenhoven R, Malmström V. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC immunology*. 2013; 14(1): 34.
77. Fiocco U, Sfriso P, Oliviero F, Pagnin E, Scagliori E. Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: the role of (CTLA4-Ig) abatacept. *Autoimmunity reviews*, 2008; 8(1): 76-82.
78. Brizzolara R, Montagna P, Soldano S, Cutolo M. Rapid interaction between CTLA4-Ig (abatacept) and synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2013; 40(5): 738-740.
79. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014; 41(1): 14-20.
80. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, Senechal B. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2009; 206(3): 595-606.
81. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005; 307(5707): 254-258.
82. Barlic J, Zhang Y, Foley JF, Murphy PM. Oxidized lipid-driven chemokine receptor switch, CCR2 to CX3CR1, mediates adhesion of human macrophages to coronary artery smooth muscle cells through a peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent pathway. *Circulation*. 2006; 114(8): 807-819.
83. Pabst O, Bernhardt G. The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *European journal of immunology*. 2010; 40(8): 2107-2111.

84. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005; 307(5707): 254-258.
85. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from anti-inflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *Journal of Experimental Medicine*. 2012: jem-20101387.
86. Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS-and IgA-mediated activities. *The Journal of Immunology*. 2001; 167(5): 2651-2656.
87. Dalmas E, Tordjman J, Guerre-Millo M, Clément K. Macrophages and inflammation. In *Adipose Tissue Biology*. Springer, Cham; 2017: 229-255.
88. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2009; 137(5): 1736-1745.
89. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, Kobayashi T, Chinen H. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009; 16(4): 568-575.
90. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*. 2014; 14(5): 329.
91. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2004; 126(6): 1593-1610.
92. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research & therapy*. 2006; 8(2): S3.

93. Mansfield CS, James FE, Craven M, Davies DR, O'Hara AJ. Remission of histiocytic ulcerative colitis in Boxer dogs correlates with eradication of invasive intramucosal *Escherichia coli*. *Journal of veterinary internal medicine*. 2009; 23(5), 964-969.
94. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005; 129(1): 50-65.
95. Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004; 53(7): 1035-1043.
96. Fortin G, Raymond M, Van VQ, Rubio M, Gautier P. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRP α + CD103 $-$ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2009; 206(9): 1995-2011.
97. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2, 3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*. 2010; 59(5), 595-604.
98. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*. 2013; 13(8): 566.
99. Ochs HD, Oukka M, Torgerson TR. TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009; 123(5): 977-983.
100. Shen W, Durum SK. Synergy of IL-23 and Th17 cytokines: new light on inflammatory bowel disease. *Neurochemical research*. 2010; 35(6): 940-946.
101. Goldberg R, Prescott N, Lord GM, MacDonald TT, Powell N. The unusual suspects—innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2015; 12(5): 271.

102. Lauterbach HH, Mattes P, Effects of dopamine on stress ulcer of rats. *Eur Surg Res*. 1977; 9(258): 4-12.
103. Nishikawa K, Amagase K, Takeuchi K. Effect of dopamine on the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *Inflammopharmacology*. 2007; 15(5): 209-213.
104. Sikiric P, Geber J, Suchanek E, Ivanovic D, Gjuris V. The role of dopamine in the formation of gastric ulcers in rats. *Eur J Pharmacol*. 1985; 112:127.
105. Sikiric P, Geber J, Ivbanovic D, Suchanek E, Gjuris V. Dopamine antagonists induce gastric lesions in rats. *Eur J Pharmacol*. 1986; 131:105.
106. Sikiric P, Rotkvic I, Mise S, Krizanac S, Gjuris V. The influence of dopamine agonists and antagonists on indomethacin lesions in stomach and small intestine in rats. *Eur J Pharmacol*. 1988; 158:61.
107. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rotkvic I, Jagic V. Comparison between the effects of dopamine drugs on gastric and liver as well as duodenal and liver lesions induced in two suitable rat models. *Dig Dis Sci*. 1990; 35:1567.
108. Szabo S, Usadel KH. Cytoprotection-organoprotection by somatostatin: gastric and hepatic lesions. *Experientia*. 1982; 38: 254.
109. Usadel KH. Hormonal and nonhormonal cytoprotective effect by somatostatins. *Hormone Res*. 1988; 29:83.
110. Robert A, Lancaster C, Olafsson AS, Gilbertson-Beadling S, Zhang W. Gastric adaptation to the ulcerogenic effect of aspirin. *Exp Clin Gastroenterol*. 1991; 1:73.
111. Sikiric P, Petek M, Rotkvic I, Rucman R, Krnjevic H. Hypothesis: stomach stress response, diagnostic and therapeutic value — a new approach in organoprotection. *Exp Clin Gastroenterol*. 1991; 1:15.

112. Sikiric P, Petek M, Rucman R, Seiwerth S, Grabarevic Z. A new gastric juice peptide, BPC—an overview of stomach/stress/organoprotection hypothesis and BPC beneficial effects. *J Physiol*. 1993; 87:313.
113. Sikiric P, Rotkvic I, Mise S, Petek M, Rucman R. Dopamine agonists prevent duodenal ulcer relapse: A comparative study with famotidine and cimetidine. *Dig Dis Sci*. 1991; 36: 905.
114. Hernandez DE, Walker CH, Valenzuela JE, Mason GA. Increased dopamine receptor binding in duodenal mucosa of duodenal ulcer patients. *Dig Dis Sci*. 1989; 34: 543.
115. Sikiric P, Rotkvic I, Mise S, Petek M, Rucman R, Seiwerth S. Dopamine agonists and H₂ receptors antagonists in duodenal ulcer treatment — a comparative blind study. *Dig Dis Sci*. 1989; 34: 1320.
116. Rotkvic I, Sikiric P, Mise S, Petek M, Rucman R. Dopamine agonists and H₂ receptor antagonists in duodenal ulcer treatment — follow-up. *Dig Dis Sci*. 1990; 35: 1567.
117. Glavin GB. Central dopamine involvement in stress-induced gastric pathology. *Clin. Neuropharmacol.* —1990; 13(3): 380-381.
118. Glavin GB. Central nervous system and gut interactions: Dopamine and experimental gastroduodenal lesions. *Life Science*. 1994; 9(51): S36–S39.
119. Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Molecular brain research*. 2005; 134(1): 57-66.
120. Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *Journal of visualized experiments: JoVE73*. 2013; 73.
121. Yeon JH, Na D, Choi K, Ryu SW, Choi C, Park, JK. Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. *Biomedical microdevices*. 2012; 14(6): 1141-1148.

122. Komuro Y, Ishihara K, Ohara S, Saigenji K, Hotta K. A new method of separation and quantitation of mucus glycoprotein in rat gastric mucus gel layer and its application to mucus secretion induced by 16, 16-dimethyl PGE 2. *Gastroenterologia Japonica*. 1991; 26(5): 582-587.
123. Akiba Y, Guth PH, Engel E, Nastaskin I, Kaunitz JD. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000; 279(2): G437-G447.
124. Romanenko EG, Klenyna IA. Method for total glycoproteins determination in saliva. *World Med. Biol*. 2012; 4:91-93.
125. Колб ВГ, Камышников ВС. Клиническая биохимия. 1976.
126. Dishe Z, Shettles LB. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J Biol Chem*. 1948; 175(2): 595-603.
127. Romanenko EG, Klenyna IA. Method for determination of hexosamines in saliva. *bul Probl Biol Med*. 2013; 2(1): 215-217.
128. Hess HH, Rolde E. Fluorometric assay of sialic acid in brain gangliosides. *Journal of Biological Chemistry*. 1964; 239(10): 3215-3220.
129. Boon ME, Hendrikse FCJ, Kok PG, Bolhuis P, Kok LP. A practical approach to routine immunostaining of paraffin sections in the microwave oven. *The Histochemical Journal*. 1990; 22(6-7): 347-352.
130. Bratthauer GL. "The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods." *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Humana Press, 2010. 257-270.
131. Castaneda FE, Walia B, Vijay-Kumar M, Patel NR, Roser S. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology*. 2005; 129(6): 1991-2008.

132. Pietrangeli CE, Edelson P, Congshavn P. Measurement of 5'-nucleotidase in mouse peritoneal macrophages in listeriosts. *Inf. Immunity*. 2001; 32(3): 1206-1210.
133. Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. *Scientific world journal*. 2011; 11: 2509-2529.
134. Vaughan RA, Foster JD. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol. Sci*. 2013; 34 (9): 489–496.
135. Takahashi H. Contribution of dopamine D1 and D2 receptors to amygdala activity in human. *The Journal of Neuroscience*. 2010; 30(8): 3043-3047.
136. Bitton A. Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *The American journal of gastroenterology*. 2003; 98(10): 2203-2208.
137. Shiga H. Life-event stress induced by the Great East Japan Earthquake was associated with relapse in ulcerative colitis but not Crohn's disease: a retrospective cohort study. *BMJ open*. 2013; 3(2): e002294.
138. Straub RH. Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 1998; 93(11): 2197-2202.
139. Kalkavoura CS, Michopoulos I, Arvanitakis P, Theodoropoulou P, Dimopoulou K, Tzebelikos E, Lykouras L. Effects of cabergoline on hyperprolactinemia, psychopathology, and sexual functioning in schizophrenic patients. *Experimental and clinical psychopharmacology*. 2013; 21(4): 332.

140. Roskoski R. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005; 331(1): 1-14.
141. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2004; 1697(1-2): 3-16.
142. Masci E, Testoni PA, Passaretti S, Guslandi M, Tittobello A. Comparison of ranitidine, domperidone maleate and ranitidine+ domperidone maleate in the short-term treatment of reflux oesophagitis. *Drugs under experimental and clinical research*. 1984; 11(10): 687-692.
143. Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Iwaki H, Yabe H, Nomoto M. Coadministration of domperidone increases plasma levodopa concentration in patients with Parkinson disease. *Clinical neuropharmacology*. 2012; 35(4):182-184.
144. Stevens JE, Jones KL, Rayner CK, Horowitz M. Pathophysiology and pharmacotherapy of gastroparesis: current and future perspectives. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2013; 14(9): 1171-1186.
145. Xiao M, Qiu X, Yue D, Cai Y, Mo Q. Influence of hippophae rhamnoides on two appetite factors, gastric emptying and metabolic parameters, in children with functional dyspepsia. *Hellenic journal of nuclear medicine*. 2012; 16(1): 38-43.
146. Kapoor AK, Raju SM. Illustrated medical pharmacology. *JP Medical Ltd*; 2013.
147. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Neunlist M. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2013; 50: 42-48.

148. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 2007; 369(9573): 1641-1657.
149. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996; 272(5258): 60-67.
150. Corfield AP, Warren BF. Mucus glycoproteins and their role in colorectal disease. *The Journal of pathology*. 1996; 180(1): 8-17.
151. Mezey E, Eisenhofer G, Hansson S, Harta G, Hoffman BJ. Non-neuronal dopamine in the gastrointestinal system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology Suppl*. 1999; 26: 14 – 22.
152. Yamamoto S, Kawana S, Miyamoto A, Ohshika H, Namiki A. Propofol-induced depression of cultured rat ventricular myocytes is related to the M2-acetylcholine receptor–NO–cGMP signaling pathway. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 1999; 91(6): 1712-1712.
153. Ampe B, Massie A, D’Haens J, Ebinger G, Michotte Y, Sarre S. NMDA–mediated release of glutamate and GABA in the subthalamic nucleus is mediated by dopamine: an in vivo microdialysis study in rats. *Journal of neurochemistry*. 2007; 103(3): 1063-1074.
154. Radulovic K, Niess JH. CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? *Journal of immunology research*. 2015.
155. Yang F, Wang D, Li Y, Sang L, Zhu J, Wang J, Sun X. Th1/Th2 Balance and Th17/Treg-Mediated Immunity in relation to Murine Resistance to Dextran Sulfate-Induced Colitis. *Journal of immunology research*. 2017.

156. Molodecky NA. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012; 142(1): 46-54.
157. Yuan SY. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular research*. 2012; 83(1): 82-88.
158. Cromer WE. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2011; 17(5): 578.
159. Eldrup E, Richter EA, Christensen NJ. DOPA, norepinephrine, and dopamine in rat tissues: no effect of sympathectomy on muscle DOPA. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1989; 256(2): E284-E287.
160. Szabo S. Dopamine and dopamine receptors in the gut: their possible role in duodenal ulceration. *Advances in dopamine research*. 1982; 37: 165-170.
161. Asano Y. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012; 303(11): G1288-G1295.
162. Bryan-Lluka LJ, O'Donnell SR. Dopamine and adrenaline, but not isoprenaline, are substrates for uptake and metabolism in isolated perfused lungs of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1992; 346(1): 20-26.
163. Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26(10): 2798-2807.
164. Mori T, Kabashima K, Fukamachi S, Kuroda E, Sakabe JI, Kobayashi M, Nakamura M. D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous

immune reactions mediated by Th2 and mast cells. *Journal of dermatological science*. 2013; 71(1): 37-44.

165. Tarnawski A, Coron E, Mosnier JF. In-vivo detection by confocal endomicroscopy of two distinct structural abnormalities in angioarchitecture and increased VP in colonic mucosa of patients with IBD in remission: mechanistic implications. *Gastroenterology*. 2009; 136: 112.

166. Colucci M, Cervio M, Faniglione M. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. *Auton Neurosci*. 2012; 169: 77–86.

167. Basu S, Nagy JA, Pal S. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2001; 7: 569–574.

168. Tolstanova G, Khomenko T, Deng X. New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 399: 613–616.

169. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol*. 2008; 43(1): 1-17.

170. Tolstanova G, Deng X, Ahluwalia A. Role of dopamine and D2 dopamine receptor in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 2015; 60(10): 2963-2975.

171. Ferrero H, Garcia-Pascual CM, Gymez R, Delgado-Rosas F, Cauli O, Simyn C, Pellicer A. Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in vitro: implications for treatment of ovarian hyperstimulation syndrome with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and sterility*. 2014; 101(5): 1411-1418.

172. Hosseini MA, Aleyasin A, Mahdavi A, Nezami R, Safdarian L, Fallahi P. The effectiveness of cabergoline for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Iranian journal of medical sciences*. 2011; 36(3): 207.
173. Hoepfner LH, Wang Y, Sharma A, Javeed N, Van Keulen VP, Wang E, Mukhopadhyay D. Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells. *Molecular oncology*. 2015; 9 (1): 270-281.
174. Tolstanova G, Khomenko T, Deng X. New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 399: 613–661.
175. Tolstanova G, Deng X, French SW. Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Lab Invest*. 2012; 92: 9–21.
176. Gomez R, Gonzalez-Izquierdo M, Zimmermann RC. Low dose dopamine agonist administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated vascular hyperpermeability without altering VEGF receptor 2-dependent luteal angiogenesis in a rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology*. 2006; 147: 5400–5411.
177. Ray A, Henke PG, Sullivan RM. Effects of intra-amygdalar dopamine agonists and antagonists on gastric stress lesions in rats. *Neurosci Lett*. 1988; 84: 302–306.
178. Ray A, Henke PG. The basolateral amygdala, dopamine and gastric stress ulcer formation in rats. *Brain Res*. 1991; 558: 335–338.
179. McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, et al. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils,

eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol.* 2002; 132: 34–40.

180. Besser MJ, Ganor Y, Levite M. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both. *J Neuroimmunol.* 2005; 169: 161–171.

181. Check JH, Katsoff B, Cohen R. Novel highly effective medical treatment of severe treatment refractory Crohn's disease using sympathomimetic amines: case report. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16: 1999–2000.

182. Check JH, Katsoff B, Cohen R. Case report showing that a woman with ulcerative colitis refractory to standard therapy responded well to the sympathomimetic amine dextroamphetamine sulfate. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17: 870–871.

183. Check JH, Amadi C, Kaplan H, Katsoff D. The treatment of idiopathic edema, a cause of chronic pelvic pain in women: effectively controlled chronic refractory urticaria—case reports. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2006; 33: 183–184.

184. Saxena B, Krishnamurthy S, Singh S. Gastroprotective potential of risperidone, an atypical antipsychotic, against stress and pyloric ligation induced gastric lesions. *Chem Biol Interact.* 2011; 190(2-3): 155-64.

185. Asmari AA, Arshaduddin M, Elfaki I. Aripiprazole an atypical antipsychotic protects against ethanol induced gastric ulcers in rats. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(8): 2031-2044.

186. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut- microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(37): 10609-10620.

187. Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012; 2(1): a009381.
188. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*. 2014; 14(5): 329.
189. Neurath MF, Travis SP. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut*. 2012.
190. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Porter CQ, Ollendorf DA, Sandler RS, Galanko JA. Direct health care costs of Crohn's disease and ulcerative colitis in US children and adults. *Gastroenterology*. 2008; 135(6): 1907–13.
191. Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010; 140: 859–70.
192. Van der Post S, Subramani DB, Backstrom M, Johansson ME, Vester-Christensen MB, Mandel U et al. Site-specific O-glycosylation on the MUC2 mucin protein inhibits cleavage by the *Porphyromonas gingivalis* secreted cysteine protease (RgpB). *J. Biol. Chem*. 2013; 288: 14636–14666.
193. Lauc G, Essafi A, Huffman JE, Hayward C, Knezevic A, Kattla JJ et al. Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet*. 2010; 6: e1001256.
194. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, Philips A et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat. Genet*. 2009; 41: 1330–1334.
195. McGovern DP, Jones MR, Taylor KD, Marcianti K, Yan X, Dubinsky M et al. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum. Mol. Genet*. 2010; 19: 3468–3476.

196. Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*. 2003; 13: 41–53.
197. Smith PL, Myers JT, Rogers CE, Zhou L, Petryniak B, Becker DJ et al. Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus. *J. Cell Biol.* 2002; 158: 801–815.
198. Lauc G, Huffman JE, Pucic M, Zgaga L, Adamczyk B, Muzinic A et al. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.* 2013; 9: e1003225.
199. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006; 313: 670–673.
200. Tailford LE, Owen CD, Walshaw J, Crost EH, Hardy-Goddard J, Le Gall G. Discovery of intramolecular trans-sialidases in human gut microbiota suggests novel mechanisms of mucosal adaptation. *Nat Commun.* 2015; 8(6): 7624.
201. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007; 448: 427–434.
202. Glavin GB, Carlisle MA, Smyth DD. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1995; 274(2), 741-744.
203. Natale G, Kastsiushenka O, Fulceri F, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. MPTP induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. *Brain Res.* 2010; 1355: 195-206.
204. Ampe B, Anissa EA, Michotte Y, Sarre S. Dopaminergic Control of the Neurotransmitter Release in the Subthalamic Nucleus: Implications for

Parkinson's Disease Treatment Strategies. Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease. Ed. Prof. Abdul Qyyum Rana. *InTech*. 2011; 421-433.

205. Kmiec Z, Cyman M, Ślebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci*. 2017; 62(1): 1-16.

206. de Lange KM, Barrett JC. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J Autoimmun*. 2015; 64: 91-100.

207. Katsanos KH, Papadakis KA. Inflammatory Bowel Disease: Updates on Molecular Targets for Biologics. *Gut Liver*. 2017; 11(4): 455-463.

208. Pinoli M, Marino F, Cosentino M. Dopaminergic Regulation of Innate Immunity: a Review. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017; 1-22.

209. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*. 2010; 10(11): 1325-1334.

210. Yamazaki M, Matsuoka T, Yasui K, Komiyama A, Akabane T. Dopamine inhibition of superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 83(5): 967-972.

211. Trabold B, Gruber M, Fröhlich D. Functional and phenotypic changes in polymorphonuclear neutrophils induced by catecholamines. *Scand Cardiovasc J*. 2007; 41(1): 59-64.

212. Yamauchi K, Kasuya Y, Kuroda F, Tanaka K, Tsuyusaki J, Ishizaki S, Matsunaga H, Iwamura C, Nakayama T, Tatsumi K. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Respir Res*. 2011; 12: 131.

213. Bergquist J, Ohlsson B, Tarkowski A. Nuclear factor-kappa B is involved in the catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 917: 281-289.

214. Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z, Zhou R. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*. 2015; 160(1-2): 62-73.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

1. **Prysiazhniuk A.**, Dovbynchuk T., Kopyak B., Tolstanova G. The role of central and peripheral D2R receptors in the mechanism of colonic vascular permeability during experimental colitis in rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, series "Problems of physiological functions regulation"*. 2017; 1(22): 39-43.

2. **A.I. Prysiazhniuk**, M.P. Rudyk, T.M. Chervinska, T.V. Dovbynchuk, I.V. Opeida, L.M. Skivka. Role of peripheral dopaminergic system in the pathogenesis of experimental colitis in rats. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2017; 89(4): 56-67.

3. **Присяжнюк А.І.**, Шолох А.О., Довбинчук Т.В., Толстанова Г.М. Загальна кількість та вуглеводний склад слизу товстої кишки щурів за умов експериментального коліту. Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. 2017; 2(78): 56-61.

4. Tolstanova G., Deng X., Ahluwalia A., Paunovic B., **Prysiazhniuk A.**, Ostapchenko L., Tarnawski A., Sandor Z., Szabo S. Role of Dopamine and Dopamine D2 receptor in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60(10): 2963-2975.

5. **Присяжнюк А.**, Нестерук К., Червінська Т., Толстанова Г. Експресія та локалізація D3-дофамінових рецепторів за умов експериментального виразкового коліту. *Вісник Київського Національного Університету ім. Тараса Шевченка*. 2015; 2(19): 10-13.
6. **Присяжнюк А.І.**, Шолох А.О., Довбинчук Т.В., Червінська Т.М., Толстанова Г.М. Роль периферичної дофамінергічної системи в патогенезі виразкового коліту у щурів. XI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених “Актуальні питання клінічної медицини” (27 жовтня 2017, Запоріжжя). Запоріжжя; 2017. с. 54-55.
7. **Prysiachniuk A.** Dovbynchuk T., Holota Y., Vareniuk I., Garmanchuk L., Tolstanova G. The mechanism of protective role of D3 dopamine receptors in pathogenesis of ulcerative colitis. In: *UEG J.* 2017; 5(5) suppl. p. 268.
8. Sholokh A., **Prysiachniuk A.**, Dovbynchuk T., Chervinska T. Effect of dopamine D3-receptor agonist on colonic mucus secretion during experimental colitis in rats / XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ”, 25-27 квітня 2017, Львів. Львів. 2017. с. 70-71.
9. M.P. Rudyk, I.V. Opeida, V.M. Svyatetska, **A.I. Prysiachniuk.** Microglia and circulating phagocyte metabolic profile in rats with MPTP-induced Parkinson’s disease and concomitant ulcerative colitis. In: 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17-19 May 2017, Genoa. Genoa, Italy; 2017. p. 151-152.
10. Tolstanova G., Chervinska T., Nesteruk K., **Prysiachniuk A.** Dovbynchuk T., Kopyak B., Nurishenko N., Serhiychuk T., Garmanchuk L., Sagach V. The role of dopaminergic system in inflammatory bowel disease pathogenesis. In: ‘Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century’, 14-15 April 2016, Kyiv. Kyiv; 2016. p. 112-113.

11. **Присяжнюк А.** Дзюбенко Н., Толстанова Г. Стан дофамінергічної системи товстої кишки пацієнтів з рецидивуючим виразковим колітом. Збірник тез: «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Міжнародна наукова конференція-конкурс молодих вчених», 26-27 травня 2016, Київ. Київ; 2016. с. 86.

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

13. **Присяжнюк А.** Дзюбенко Н., Керничний В., Червінська Т., Толстанова Г. Роль Д3-дофамінових рецепторів в патогенезі виразкового коліту. Збірник тез: “Об’єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень”, 10-11 листопада, Київ. Київ, 2016; с. 44-45.

14. Kernychnyi V., Dziubenko N., **Prysiazhniuk A.** Tolstanova G. Impaired Peripheral Dopaminergic System in Patients with Ulcerative Colitis. In: The FASEB Journal. 2015; 29(1): Suppl. LB544.

15. **Присяжнюк А.** Дзюбенко Н., Керничний В., Толстанова Г. Стан дофамінергічної системи товстої кишки пацієнтів з рецидивуючим виразковим колітом. Збірник тез конференції молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015”, 23-24 квітня 2015, Київ. Київ; 2015. с. 55.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: Європейському гастроентерологічному тижні UEGW-2017 (Барселона, Іспанія); XI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених “Актуальні

питання клінічної медицини” (Запоріжжя, Україна, 2017); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ” (Львів, Україна, 2017); 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (Генуя, Італія, 2017); ‘Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century’ (Київ, Україна, 2016); «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології: Міжнародна наукова конференція-конкурс молодих вчених» (Київ, Україна, 2016); ‘9th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection’ (Краків, Польща, 2016); “Об’єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень” (Київ, Україна, 2016); міжнародній літній школі ‘Perspectives for young scientists in life sciences: mastering global challenges of the modern society’ (Івано-Франківськ, Україна, 2016); міжнародній конференції ‘Experimental Biology’ (Бостон, США, 2015); “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2015” (Київ, Україна, 2015).