МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГОЛИШКІН ДМИТРО ВІТАЛІЙОВИЧ

УДК 57.018.34:619:615:612.176

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

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.
Підпис:_____ Д.В. Голишкін

Науковий керівник: д.б.н., проф. Фалалєєва Тетяна Михайлівна

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, Київ, 2017.

Зростання відсотку хворих на виразкову хворобу (ВХ) шлунку пов'язано, насамперед, із впливом психоемоційного стресу на організм людини, який є одним з головних етіологічних факторів, що призводить до розвитку ВХ та є невід'ємною частиною нашого життя.

На сьогодні існує низка ефективних фармакологічних препаратів для лікування ВХ, проте вони мають обмежене значення для профілактичного застосування у зв'язку з побічною дією. Аналіз літератури показує, що для профілактики найчастіше використовують різноманітні фітопрепарати з антиоксидантною дією, насамперед, поліфенольної природи. До таких сполук належить меланін. Він володіє не лише потужною антиоксидантною, але і антибактеріальною, протизапальною та цитопротективною дією. Подібні ефекти притаманні й іншій сполуці – наночастинкам діоксиду церію (НДЦ). Ми припустили, що меланін та НДЦ будуть ефективними у профілактиці ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунку (СОШ), викликаних дією стресу. У літературі є поодинокі роботи про позитивний вплив меланіну при ураженнях СОШ, викликаних різними чинниками (серотонінова, етанолова, норадреналінова та іммобілізаційна моделі виразкоутворення), та відсутні дані про вплив НДЦ на СОШ за дії стресу. Таким чином, актуальність роботи полягає в необхідності дослідження нових засобів профілактики стрес-індукованих уражень шлунку.

Мета роботи – з'ясувати вплив меланіну та НДЦ на стан СОШ та реакцію кори надниркових за умов дії гострого стресу викликаного нервово-м'язовим

напруженням за Сельє. Для досягнення поставленої мети було змодельовано вплив емоційного стресу за Сельє на щурах. Встановлено, що при пероральному введенні меланіну та НДЦ ураженість СОШ у порівняні з групою стрес-контролю, була значно меншою. У групі щурів, яким за 30 хв до початку дії стресу вводили меланін, площа виразок була меншою на 64 % ($p<0,05$). Стосовно ерозій, спостерігалася лише тенденція до їх зменшення. Введення НДЦ зменшувало площу виразок на 41,7% ($p<0,05$), порівняно з групою щурів стрес+вода. При введення НДЦ відмічалася лише тенденція до зменшення ерозій. Моделювання іммобілізаційного стресу супроводжувалося гіпертрофією наднирникових залоз (НЗ) та інволюцією тимусу. За умов профілактичного введення меланіну та НДЦ показники коефіцієнту маси наднирників та тимусу були на рівні контрольних значень.

Активація імунної відповіді й запального процесу збільшує системний вміст глюкокортикоїдів, що зумовлює зниження утворення колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу, тоді як їх наявність в СОШ у вільній формі може вказувати на патологічні зміни слизової оболонки. За таких умов відбувається руйнування СОШ, що виявляється у зростанні концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуронових кислот. Вперше продемонстровано, що при профілактичному введенні, меланін та НДЦ попереджають деградацію протективних колагенових і неколагенових білків слизово-епітеліального бар'єру шлунку обумовлену дією стресу. При введенні меланіну вміст вільного оксипроліну в СОШ знижувався на 29% ($p<0,001$), тоді як введення НДЦ зменшувало його вміст на 16% ($p<0,001$) порівняно з групою стрес+вода. Відмічалося достовірне зменшення вмісту вільної фукози в пристінковому слизі після введення меланіну стресованим щурам на 16% ($p<0,001$) та після введення НДЦ на 14% ($p<0,05$) порівняно з відповідними групами стрес+вода. При профілактичному введенні меланін чинив захисний вплив на СОШ, що підтверджувалося зменшенням вмісту вільних гексуронових кислот на 24% ($p<0,001$) порівняно з щурами, яким перед нанесенням стресу вводили воду. У

тварин, яким було введено НДЦ рівень гексуронових кислот знижувався на 28,7% ($p<0,001$) у порівнянні з групою стрес+вода.

Введення досліджуваних сполук призводило до відновлення порушеної про- та антиоксидантної рівноваги в СОШ та плазмі крові щурів за умов дії стресу. Так, профілактичне введення меланіну щурам, що підлягали впливу стресу сприяло збільшенню активності супероксиддисмутази ($p<0,05$), при цьому рівень каталази був в межах контрольних значень ($p<0,05$). При порівнянні антиоксидантних властивостей меланіну та НДЦ було показано, що активність супероксиддисмутази у групі введення НДЦ зросла на 29,4% ($p<0,05$) тоді як активність каталази знизилась на 35,3% ($p<0,05$) відповідно до показників групи стрес-контролю. Вперше встановлено імунопротективний ефект меланіну та НДЦ за показниками лейкоцитарної формули крові, а також станом про- та антизапальних цитокінів крові за умов дії гострого стресу. Встановлено, меланін, при одноразовому введені справляв більш виражений захисний вплив на СОШ до дії стресу у порівнянні з НДЦ. Тому подальші дослідження були зосереджені на меланіні. Показано, що введення меланіну стабілізувало рівень АКТГ та кортизолу в організмі щурів. Введення тваринам меланіну перед дз'. стресу викликало підвищення концентрації АКТГ на 42% ($p<0,05$) та одночасне зниження кортизолу на 19% ($p<0,05$) відносно значень групи стрес+вода. Вперше досліджено мембранотропну активність меланіну, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару, в умовах впливу меланіну на модель бімолекулярної ліпідної мембрани. Доведено, що меланін є перспективним засобом фармакологічної корекції стресу та може бути рекомендований до подальшого доклінічного вивчення.

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

ABSTRACT

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

Thesis for PhD degree in specialty 03.00.13 – Human and animal physiology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

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

It was found that when melanin was administered 30 minutes before the stress at a dose of 5 mg/kg (*per os*) and NCD at a dose of 1 mg/kg (*per os*), the severity of GM damage was significantly lower compared to the stress-control group. There was found only a tendency in the decrease of erosions under the influence of both substances. In the group of rats, which received melanin 30 minutes before stress, the area of the ulcers was less than 64 % ($p < 0.05$). There was only a tendency to the decrease of erosions. The administration of NCD reduced the area of ulcers by 41.7 % ($p < 0.05$), compared with the stress+water group. NCD administration caused the erosion reduce in a tendency. Immobilization stress was accompanied by hypertrophy of the adrenal and thymus involution. After three hours of neuromuscular stress by Selye, the mass of the adrenal glands increased, while the thymus mass decreased. Under conditions of prophylactic administration of melanin and NCD, the adrenal and thymus mass ratios were at the control level.

Activation of the immune response and the inflammatory process increases the systemic content of glucocorticoids, which leads to the decreased formation of collagen and compounds of the extracellular matrix, whereas their presence in the GM in free form may indicate pathological changes in the mucous membrane. Under

these conditions destruction of GM was observed, idicated by the concentration growth of free oxyproline, fucose and hexaronic acids.

It has been demonstrated that prophylactic administration of melanin and NCD prevents stress-following degradation of protective collagen and non-collagen proteins of the mucosal-epithelial gastric barrier, indicated by a decrease in the concentration of free oxyproline, fucose and hexuronic acids. After melanin admisitration free oxyproline was decreased by 29 % ($p < 0.001$), whereas the administration of NCD reduced its content by 16 % ($p < 0.001$) compared with the stress+water group. Significant decrease in the content of free fucose (at 16%, $p < 0.001$) was shown in the mucous membrane after melanin administration to stress+water group. After melanin admisitration, free oxyproline was decreased by 29% ($p < 0.001$), whereas the administration of NCD reduced its content by 16% ($p < 0.001$) compared with the stress + water group. Significant decrease in the content of free fucose (at 16%, $p < 0.001$) was shown in the mucous membrane after melanin administration compared with the stress+water group. Administration of NCD also shoned decreasing of free fucose level by 14% ($p < 0.05$) compared with the stress + water group. In prophylactic administration melanin had a protective effect on GM, which was confirmed by a decrease in the content of free hexaronic acids by 24% ($p < 0.001$) compared with rats, which were injected with water before stress. In animals after NCD administration, the level of hexaronic acids decreased by 28.7% ($p < 0.001$) compared with the stress+water group. In this case, the integrity of the mucous barrier was close to the values of control rats that confirmed by the results of macroscopic analysis of GM. Prophylactic administration of melanin and NCD resulted in the restoration of an excited pro-and antioxidant balance in rats GM under acute stress conditions, which is confirmed by the activation of the enzymes of the antioxidant defense and the decrease in the content of lipid peroxidation products. Thus, the prophylactic administration of melanin contributed to an increase in the activity of superoxide dismutase ($p < 0.05$), while the level of catalase was within the control values ($p < 0.05$). It was shown that superoxide dismutase activity in NCD group increased by 29.4% ($p < 0.05$) while catalase activity decreased by 35.3%

($p < 0.05$) according to stress+water groups. Melanin and NCD exhibited immunomodulatory properties by action on stress-induced shift in blood leukocyte formula and stabilization of pro- and anti-inflammatory cytokines level.

As a result, melanin single injection produced more pronounced protective effect on the GM compared with NCD under acute stress conditions. Therefore, further research was focused on the study of the melanin polyphenolic compound. It was shown that the administration of melanin affected the stabilization of the ACTH and cortisol levels in rat serum. Melanin administration before stress caused an increase in the concentration of ACTH at 42% ($p < 0,05$) and reduction of cortisol level by 19% ($p < 0,05$) compared to the values of the stress+water group. The mechanism of melanin penetration through the central hydrophobic zone of cell membranes was proposed for the first time. It was shown on the basis of established membranotropic activity. It is realized by increasing the conductivity and decreasing the electric capacity of the lipid bilayer model. This explains the implementation of the antioxidant properties of melanin at the cellular level.

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

Key words: stress, adrenal glands, cortisol, cytokines, stomach ulcer, melanin, nanocrystalline cerium dioxide.

Список публікацій здобувача

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

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

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

4. Голишкін Д.В. Особливості лейкоцитарної формули крові щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразкових уражень шлунку та профілактичного введення меланіну / Д.В. Голишкін, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова, Н.В. Чижанська, Л.І. Остапченко // Український антарктичний журнал. – 2015. – №14. – С. 100-104.

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

6. Golyshkin D. Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension according to Selye / Ya. Savytskyy, T. Falalyeyeva, D.Golyshkin //Annales universitatis Mariae Curie – Sklodowska.- 2010. – №2.- P. 251-255. (Scopus).

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

8. Голишкін Д.В. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунку щурів, викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє / Д.В. Голишкін, Т.М. Фалалєєва, В.М. Кухарський // V Міжнародна наукова

конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології", 13-15 травня, 2009. Львів, Україна. – С. 244-245.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……13
ВСТУП ……..14
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ……...20
1.1. Патогенез виразкової хвороби та стратегії лікування……20
1.2. Стрес, як загальний адаптаційний синдром організму……..…23
1.2.1.Механізми стрес-індукованого ураження СОШ……24
1.3. Перспективи використання похідних поліфенольних сполук, як гастропротекторних препаратів……..... 26
1.4. Класифікація та синтез меланінів…….…….. 29
1.4.1. Біологічна роль і функції меланінів…… 33
1.4.2. Перспективи використання меланіну, як наносполуки……..…. 37
1.5. Біологічна роль і функції нанокристалічного діоксиду церію……..... 39
1.5.1. Фізикохімічні властивості НДЦ та показники токсичності……. 40
1.5.2. Накопичення та виведення нанокристалічного діоксиду церію в організмі……... 43
1.5.3. Механізм антиоксидантної ензимо-міметичної активності НДЦ ... 43
1.5.4. Гастропротекторний вплив нанокристалічного діоксиду церію…. 45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ……...…… 50
2.1. Умови та схема проведених експериментів……..…….. 50
2.1.1. Групи тварин з дослідження впливу меланіну за умов дії стресу... 50
2.1.2. Групи тварин з дослідження нанокристалічного діоксиду церію за умов дії стресу……...……51
2.2. Метод нервово-м’язового напруження за Сельє……51
2.3. Забір біологічних зразків ……...……...52
2.4. Визначення продуктів катаболізму білків слизової оболонки і пристінкового слизу шлунку ……..…… 53
2.5. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів ……...55
2.6. Визначення активності ферментів антиоксидантної системи у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів ……..….57
2.7. Підготовка та фарбування мазків крові щурів ……...……58
2.9. Підрахунок лейкоцитів ……...……...61
2.10. Визначення вмісту кортизолу у сироватці крові щурів ……..……61

2.11. Визначення вмісту адренокортикотропного гормону у сироватці крові щурів ..…62
2.12. Метод визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран …… 62
2.12. Аналіз вмісту цитокінів в сироватці крові щурі ……... 63
2.13. Статистична обробка даних …… 64
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ МЕЛАНІНУ ТА НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ТА РЕАКЦІЮ КОРИ НАДНИРНИКІВ ЗА УМОВ ДІЇ ГОСТРОГО СТРЕСУ ……..... 65
3.1. Дослідження стреспротективної дії досліджуваних речовин……67
3.1.1. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на розвиток уражень в слизовій оболонці шлунку за умов нервово – м’язового напруження ……67
3.1.2. Визначення впливу меланіну та НДЦ на зміну маси органів стрес протекторної системи ……..74
3.1.3. Стан слизового бар’єру шлунку за умов нервово – м’язового напруження та профілактичного введення меланіну та НДЦ ……..77
3.2. Дослідження антиоксидантних властивостей досліджуваних речовин …...84
3.2.1. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан прооксидантної системи щурів……84
3.2.2. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан антиоксидантної системи щурів……89
3.3. Встановлення антизапальних властивостей досліджуваних речовин…….. 93
3.3.1. Визначення впливу меланіну та НДЦ на лейкоцитарну формулу крові щурів ……..…….. 93
3.3.2. Вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов нервово-м’язового напруження та введення меланіну та НДЦ……96
3.4. Вплив меланіну на рівень гормонів кортизолу та адренокортикотропного гормону щурів за умов нервово-м’язового напруження……..103
3.5. Визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран……...…107
УЗАГАЛЬНЕННЯ ……....……...111
ВИСНОВКИ ……...….126
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ……129

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АКТГ – адренокортикотропний гормон

АФК – активні форми кисню

БЛМ – бімолекулярні ліпідні мембрани

ВХ – виразкова хвороба

ГПЛ – гідроперекис ліпідів

ГПО – глутатіонпероксидаза

ГТР – глутатіонтрансфераза

ДОФА – дигідроксифенілаланін

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

КАТ – каталаза

НАДН – нікотинамідаденінденуклеотид відновлена форма

НДЦ – нанокристалічний діоксид церію

НСТ – нітросиній тетразолій

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СОД – супероксиддисмутаза

СОШ – слизова оболонка шлунку

ТБК – тіобарбітурова кислота

ТХО – трихлороцтова кислота

ФМС – феназинметасульфат

ЦВАХ– циклічні вольт-амперні характеристики

NO – нітрогену оксид

ВСТУП

Актуальність теми. Виразкова хвороба шлунку і дванадцятипалої кишки займає провідне місце в структурі захворювань внутрішніх органів, та реєструється приблизно у 10-20% дорослого населення[1]–[4]. В Україні, за даними Центру медичної статистики, захворюваність на виразкову хворобу за останні роки зросла на 38,4% [5], [6]. В нашій країні первинна інвалідизація хворих виразковою хворобою складає в середньому 17,1 % від усіх гастроентерологічних захворювань[5], [7]. Зростання відсотку хворих на цю патологію пов'язано, насамперед, із впливом психоемоційного стресу на організм людини, який є одним з головних етіологічних факторів, що призводить до розвитку виразкової хвороби та є невід'ємною частиною життя. Ця невтішна статистика не враховує гастропатії викликані нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП). НПЗП-гастропатії – ерозивно-виразкові ураження гастро-дуоденальної зони, пов'язані з прийманням НПЗП, які часто використовують в клінічній практиці лікарі широкої спеціалізації. Відповідно до офіційної статиски, що грунтується на рецептурній видачі препаратів, щодня в світі понад 30 млн людей приймають НПЗП, а серед людей старших за 65 років НПЗП застосовують 10-20 %[7]. Наразі неконтрольоване застосування НПЗП продовжує зростати[8].

На сьогодні існує низка ефективних фармакологічних препаратів для лікування виразкової хвороби, насамперед, інгібітори протонної помпи, блокатори H_2-гістамінових рецепторів та ін. [9], [10]. Вказані засоби мають обмежене значення для профілактичного застосування (політравми, інфаркт міокарда) у зв'язку з побічною дією [11]–[14]. Аналіз літератури показує, що для профілактики найчастіше використовують різноманітні фітопрепарати [15], [16] та фітоконцентрати [17]–[19] з антиоксидантною дією, яку забезпечують різні біологічно-активні сполуки, насамперед, поліфенольної природи [20]–[22].

До таких сполук належить меланін, продуцентом якого є антарктичні мікроорганізми *Pseudonadsoniella brunea* (раніше *Nadsoniella nigra* X-1). Меланін, зазначеного походження, являє собою поліфенолкарбоновий комплекс [23], [24]. Він володіє не лише потужною антиоксидантною, але і антибактеріальною, протизапальною, цитопротективною дією [25]–[27]. Подібні ефекти притаманні й іншій біодоступній наносполуці – наночастинкам діоксиду церію (НДЦ)[28]–[30]. Ми припустили, що меланін та НДЦ будуть ефективними у профілактиці ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунку (СОШ), викликаних дією стресу за Сельє. Вказана модель стресу є найбільш наближеною до природних умов і поєднує в собі елементи емоційного та фізичного стресу та рекомендована Державним експертним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів [31]. У літературі є поодинокі роботи про позитивний вплив меланіну при ураженнях СОШ [25], [32], викликаних різними чинниками (серотонінова, етанолова, норадреналіновго та іммобілізаційна моделі виразкоутворення), та відсутні дані про вплив НДЦ на СОШ за дії стресу. Таким чином, актуальність роботи полягає в необхідності дослідження нових засобів профілактики стрес-індукованих уражень шлунку.

У зв’язку з зазначеним метою даної роботи було дослідити вплив меланіну та НДЦ на стан слизової оболонки шлунку та реакцію кори надниркових за умов дії гострого стресу, викликаного нервово-м’язовим напруженням за Сельє.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.Дисертаційна робота виконана в рамках наукових тем Відділення біологічних та біомедичних технологій НДЛ «Фармакології і експериментальної патології» ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Доклінічне дослідження підгострої токсичності меланіну, виділеного з антарктичних мікроорганізмів» № 13ДФ036-04 (державний реєстраційний номер 0113U006059) та «Доклінічні дослідження токсичності меланіну – субстанції для нових лікарських

препаратів та ефективності дерматотропних препаратів на основі наночастинок» № 16БП036-04 (державний реєстраційний номер 0116U004828), а також за підтримки та на замовлення Держінформнауки ДУ «Національний антарктичний науковий центр» Міністерства освіти і науки України №Н/6-2012 (12ДФ036-08) від 01 серпня 2012 р. «Визначення механізму профілактично-лікувальної дії біологічно активних речовин, виділених з антарктичних організмів» (державний реєстраційний номер 0112U004870).

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

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні задачі дослідження:

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

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

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

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

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

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

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

Методи дослідження:Фізіологічні (вплив стресу на організм), біофізичні (електричні характеристики біліпідних мембран), біохімічні (визначення вмісту ПОЛ та активності антиоксидантних ферментів), імуноферментні (визначення концентрації гормонів та цитокінів), гематологічні (підрахунок лейкоцитів) та методи математичної статистики.

Наукова новизна результатів дослідження. Дисертаційна робота була скерована на пошук нового ефективного стреспротектора. Розширено розуміння цитопротективної дії меланіну та НДЦ. Обидві сполуки знижують прояви ерозивно-виразкових уражень, викликаних моделюванням стресу. Вперше продемонстровано, що при профілактичному введенні, меланін та НДЦ попереджають формування продуктів деградації СОШ за показниками вільного оксипроліну, фукози та гексуронової кислоти, що є основою слизового бар'єру.

Вперше встановлено імунопротективний ефект меланіну та НДЦ за показниками лейкоцитарної формули крові, а також станом про- та антизапальних цитокінів крові за умов дії гострого стресу викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє.

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

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати свідчать про цитопротективну дію меланіну та НДЦ за умов стресу. Такі препарати можуть слугувати ефективними засобами для профілактики і лікування наслідків екологічних та техногенних катастроф, бойових дій,

оперативних і стоматологічних втручань. Вони можуть використовуватися як допоміжні засоби в умовах, що викликають психоемоційний стрес та напруження механізмів адаптації.

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

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені і обговорені на V Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2009); XIV Міжнароній медичний конгрес студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2010); VII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2011); V Міжнародна Антарктична Конференція "Антарктика і глобальні системи землі: нові виклики та перспективи" (Київ, 2011); III Международная

научно-практическая конференция «Достижения молодых ученых в развитии инновационных процессов в экономике, науке, образовании» (Брянск, 2011); 4th International Scientific Conference "Advances in pharmacology & pathology of the digestive tract" (Kiev, 2012); VII Міжнародна конференція молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери" (Харків, 2012); IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2013); VI Міжнародна Антарктична Конференція "Інтерналізація досліджень в Антарктиці – шлях до духовної єдності людства" (Київ, 2013); II Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження 2014» (Київ, 2014); XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2015); VII Міжнародна Антарктична Конференція "Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети" (Київ, 2015); Науково-практична конференція «Пробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (2015, Київ); Міжнародна конференція «Зимові наукові читання» (частина 2) (2016, Київ); Advanced Lecture Course «Molecular basis of human disease" (2016, о. Спецес, Греція); VIII Міжнародна наукова конференція "Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології" (2017, Київ).

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

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патогенез виразкової хвороби та стратегії лікування

За даними Всесвітньої організації охорони здоров’я, тенденція смертності від виразкової хвороби у світі буде зростати до 2030 року[41]. Виразкова хвороба шлунку діагностується при ендоскопії, коли є розрив слизової оболонки діаметром 5 мм або більше, покритий фіброзним нальотом по краю; розрив слизових оболонок менше, ніж 5 мм, називається ерозія. Критерій 5 мм довільний, але використовується в клінічні випробуваннях [42]. Переважним місцем локалізації виразки шлунку є кутова вирізка (Incisura angularis), розташована на перетині між малою кривизною шлунку та пілоричним відділом. Проте, виразкові ураження слизової можуть локалізуватися в будь-якому місці від пілоричного до кардіального відділу. [42].

Складний і багатофакторний патогенез виразкової хвороби досліджувався протягом декількох десятиліть, і результатом було визнана етіологія ВХ через дисбаланс агресивних чинників шлункового соку і захисних функцій слизового бар'єру [43]. Серед основних ульцерогенних факторів виділяють інфекційні запалення (*Helicobacter pylori (H.pylori)*) та ураження слизового бар’єру шлунку такі як вживання нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) та глюкокортикоїдів, фізичний та емоційний стресс [13]. Серед зовнішніх факторів виділяють куріння, зловживання алкоголем та вживання наркотиків, що найбільш часто зустрічаються у пацієнтів ВХ, але жоден з них, крім використання НПЗЗ, не були ідентифіковані в якості індивідуального ульцерогенного агента [16].

Різноманіття хімічних препаратів в даний час доступні для профілактика і лікування виразкової хвороби, але жоден не характеризується відсутністю побічних ефектів. Блокатори гістамінових Н2-рецепторів ($БГН_2Р$) представляють собою клас препаратів, які пригнічують секрецію кислоти, діючи в якості конкурентоспроможних антагоністів гістаміну на рецептор H_2 парієтальних клітин, відносно ефективно впливають на усунення ВХ інфекційної природи (*H. pylori)* та за умов тривалого вживання НПЗП[8]. Проте до побічних ефектів $БГН_2Р$ відносять головний біль, анти-андрогенний ефект, панкреатит і сплутаність свідомості у літніх пацієнтів. Інгібітори протонної помпи (ІПП) діють шляхом пригнічення Н-К-АТФази парієтальних клітин [44]. До пібічної дії ІПП слід віднести свербіж, шкірний висип, діарею, запаморочення та інактивацію деяких протигрибкових препаратів. Так само, розлад шлунку, сонливість, нудота, запори, запаморочення, і біль у спині є одними з основних побічний ефектів сукральфату, сучасного ативиразквого препарту групи антацидів та сорбентів. Мізопростол, який вводиться для профілактики і лікування НПЗЗ-індукованих виразок шлунку, має різні побічні ефекти, такі як: болі в животі, діарея, вагінальна кровотеча, запор [45].

Профілактика та ефективна ремісія шлунково-кишкових виразок залишається проблемою як для дослідників так і для лікарів [46]. З огляду на очевидність ролі хелікобактерної інфекції при гастриті і шлунково-кишкових виразок все більше залучається різні комбіновані терапії . Хоча комбінована терапія інгібітора протонної помпи з антибіотиками покращує симптоми і стан захворювання за допомогою підвищення ерадикації, цей терапевтичний підхід не є зазвичай успішним у випадках виразкових рецидивів та резистентності сучасної бактеріофлори до стандартного лікуваннння. Деякі дослідники повідомили про неефективність лікування, для антибіотиків, що містять кларитроміцин і метронідазол, проти інфекції *H. Pylori*, що веде до серйозних наслідків в регуляції виразкової хвороби [47].

На сьогодні майже 50% населення земної кулі колонізовані *H. pylori* , проте дана інфекція викликає захворювання лише в 20% людей [13]. Частка людей у

яких виникнення виразкової хвороби не асоційована з впливом *H. pylori* та вживанням НПЗП невпинно зростає. Показано, що в 16%-31% випадків ВХ може розвиватись у *H. pylori* негативних пацієнтів які не проходять курс лікування НПЗП отже супутні фактори і альтернативні шляхи розвитку хвороби повинні бути розглянуті[42], [48], [9].

У дослідженні Levenstein 2014 et al. було вивчено зв'язок між впливом соціального стресу та виразкоутворенням серед населення Данії. Було показано, що стрес є ключовим прогностичним фактором виникнення виразкової хвороби асоційованої з *H. pylori*, НПЗП, курінням та низьким соціоекономічним статусом [48].

Емоційний стрес і психосоціальні чинники часто асоціюють, як важливі фактори у виразковому патогенезі [49]. Є переконливі докази, ключової ролі психоемоційного стесу у розвитку виразки ДПК[50]. На користь емоційного стресу, як ключового фактору що сприяє ульцерогенезу, було зростання кровоточивих виразок шлунку у літніх людей після сильного землетрусу в Японії [51] Єтіологічним фактором стрес також виступає у випадку виразкових кровотеч в контексті важких соматичних уражень, таких як черепно-мозкова травма, опіки, сепсис з поліорганною недостатю у відділеннях інтенсивної терапії[48].

Отже сучасна фармакотерапевтична стратегія направлена на пригнічення одного або кількох ланок, що беруть участь патогенезі виразкової хвороби проте комплексний підхід потребує комплекного вирішення цієї проблеми. Актуальними є препарати, що здатні компенсувати захисні ресурси організму такі як систему антиоксидантного захисту, а також підвищити резистентність СОШ до стресу та патогенної мікрофлори проте не мають побічних ефектів, що притаманні вищенаведеним сучасним лікарським засобам. На сьогодні таким рішенням може бути природні препарати комплексної дії значну увагу серед яких приділяють поліфенольним сполукам. Розробки в галузі наномедицини та нанобіології є перспективною галуззю, що також потребує проведення досліджень та пошуку потенційних гастропроекторів комплексної дії.

Розуміння механізмів їх дії проти стрес індукованого ураження слизової оболонки шлунку, як основної причини виразкової хвороби може стати ключовим фактором у боротьбі з даною патологією.

1.2. Стрес, як загальний адаптаційний синдром організму

Згідно з останнім визначенням Ганса Сельє, автора теорії стресу, біологічний стрес є неспецифічна реакція організму на будь-який подразник, що впливає на нього [52]. Розвиток теорії стресу бере свій початок з робіт Волтера Кеннона, яким була описана реакція організму на неспецифічне подразнення, що обмежується нейроендокринною відповіддю шляхом вивільнення катехоламінів. Підкреслюючи важливість мозкової речовини наднирників, описану Кенноном у своїх роботах, як важливу частину стрес відповіді організму Ганс Сельє, автор «теорії стресу», наголошував, що ключова роль в розвитку стрес реакції організму належить корі наднирників, а загалом гіпоталамо-гіпофізарно-надниркововозалозній (ГГН) осі [53]. На його думку стрес це загальний адаптаційний синдром, який може бути викликаний не тільки фізичною напруго, але й позитивними подіями, емоціями хвилювання, і навіть радістю [54]. За Сельє загальний адаптаційний синдром розвивається в три етапи: “сигнальна реакція”, або стадія тривоги, друга стадія “опору”, і третя стадія виснаження організму. Більшість характерних проявів стадії тривоги включає активацію катаболізму в тканинах, гіпоглікемію, ерозіогенез шлунково-кишкового тракту, секреторну гіперактивність кори надниркових залоз, підвищення концентрації гемоглобіну в крові т.д.. Дані прояви зникають або інгібуються на стадії опору, але проявляються знову у більш важкій формі на стадії виснаження організму[55].

Революційність ідей Сельє полягало у визнанні того, що стресогени різної природи (спека або холод, вимушена іммобілізація або фізичні вправи; хімічні, біологічні та психологічні агенти) завжди викликають однакову нейроендокринну (тому, неспецифічну) відповідь, яка полягає у підвищенні

секреції адренокортикотропного гормону (АКТГ) гіпофізом, що призводить до підвищеного вивільнення глюкокортикоїдів з надниркових залоз [52]. Відповідь на органному рівні є «тріада стресу», зміни у якій спостерігається навіть на макроскопічному рівні: збільшення надниркових залоз, виразкоутворення шлунково-кишкового тракту і атрофія тимусу. Зміни даних показників слугують первинними прогностичними маркерами стресу по сьогодні [53].

У людей вплив стресу пов'язаний з індукцією або загостренням виразкової хвороби шлунку, ДПК і згідно з деякими дослідженнями, навіть тонкого та товстого кишечника [55] Тоді як у гризунів стрес будьякої інтенсивності та природи впливає на виразкоутворення виключно на рівні шлунку[52].

1.2.1 Механізми стрес-індукованого ураження СОШ

Основними регуляторними ланками стрес-реакції організму є нервова та імунна система. Під час відповіді на порушення гомеостазу обидві системи знаходяться у процесі обміну інформації про тип подразника та механізми швидкої реакції на нього[56]. Активація симпато-адреналової системи і катехоламінергічних структур при емоційному стресі, та активація імунної системи і цитокін-сигнальних структур при порушенні структурної цілісності тканин організму призводять до запуску центральної ланки адаптивної реакції організму, а саме ГГН осі [57]. Емоційно-фізичне навантаження чинить активуючий вплив на паравентрикулярне ядро гіпоталамусу, що обумовлює виділення кортикотропін-релізинг-гормону (КРГ), первинного медіатора ГГН вісі. Через систему портальних капілярів КРГ потрапляє до передньої долі гіпофіза. Він регулює синтез проопіомеланокортину (ПОМК), попередника таких нейропептидів, як адренокортикотропний гормон (АКТГ) передньої долі гіпофіза, α-меланоцит-стимулюючий гормон (α-МСГ) і β-ендорфін, що синтезуються послідовно у проміжній долі гіпофіза [58], [59]. Після вивільнення в системний кровотік, АКТГ досягає наднирникових залоз та

стимулює через MC2R рецептори секрецію основних біомаркерів стрес-реакції глюкокортикоїдів (кортизолу, кортизону та кортикостерону) [58].

Внутрішньоклітинно, глюкокортикоїди взаємодіють з ядерними глюкокортикоїдними рецепторами (ГР), що організовує широкий спектр відповідей на клітинному рівні, який закінчується на рівні обміну речовин (вуглеводів, білків і ліпідів), функції імунної системи, тонусу судин, мінералізації кісток, і регуляції функцій центральної нервової системи [60].

Механізм, відповідальний за ураження слизової оболонки шлунку, викликаних глюкокортикоїдами, за умов тривалої дії стрес-фактора, включає інгібування синтезу шлункового слизу через супресію метаболізму арахідонової кислоти і синтезу простагландинів (ПГ), посиленням секреції гідрохлоридної кислоти через посилення виділення гастрину, а також гіперплазію обкладових клітин [61]–[63].

ПГ відіграють значну роль в запобіганні виразкоутворення і поліпшення загоєння наявних уражень шлунку. Синтез ПГ пов'язаний з активністю фосфоліпази А2, яка впливає на продукцію арахідонової кислоти та циклооксигенази 1 та 2 (ЦОГ), що несуть важливий внесок у синтез різних форм ПГ. ЦОГ-2 похідний ПГ-Е2 збільшує експресію фактора росту ендотелію судин, який стимулює проліферацію ендотеліальних клітин і ангіогенез [64]. Введення глюкокортикоїдів пригнічує синтезу фосфоліпази А2 та ЦОГ-2 і як наслідок синтез ПГ, що є ключовим фактором, сповільнення загоєння виразкових уражень [65].

В свою чергу гоєння виразки є процес, пов’язаний з балансом між пошкодженням клітин (імунна відповодь) і факторами ангіогенезу, проліферації та апоптозу залученими в механізм регенерації тканини [43], [66]. На ранній стадії регенерація СОШ відбувається за відсутності клітинної проліферації і називається реституцією або клітинною міграцією від краю рани щоб відновити епітеліальну цілісність [63]. Відомо, що (TNF) -α, стимулюює міграцію клітин, за рахунок збільшення виробництва фактор росту гепатоцитів (HGF), а також ІЛ-8 [67]. Показано, що дексаметазон, потужний синтетичний

глюкокортикод, пригнічував TNF-α-стимульовану міграцію клітин, що було пов'язано зі зменшенням експресії ЦОГ-2 і зниженням рівня ПГ-Е2 СОШ щурів [63]. Пізніший етап регененерації глибокого пошкодження тканин СОШ включає в себе клітинну проліферацію, а також ангіогенез гранулярної тканини для відновлення архітектури слизової і підслизової оболонки [68]. Введення дексаметазону у дозуванні, що еквіваленте стандартному лікуванню пацієнтів глюкокортикоїдами, інгібувало EGF та bFGF, проліферацію клітин та гоєння виразкових уражень. При цьому введення антагоніста глюкокортикоїдних рецепторів міфепристона повністю припиняло дію дексаметазону [69]. Наведені дані вказують на важливість пошуку препаратів, що володіють стрес протекторними властивостями комплексної дії.

1.3 Перспективи використання похідних поліфенольних сполук, як гастропротекторних препаратів

Поліфенольні сполуки є одними з основних джерел антиоксидантів у нашій дієті й широко представлені у фруктах, овочах, хлібних злаках, оливках, представниках бобових, шоколаді, а також чаї та вині. Не дивлячись на їх широку поширеність, основну увагу поліфенольним сполукам почали приділяти лише в останні роки. Основним фактором, відповідальним за сповільнені темпи дослідження поліфенольних сполук, є їх широке різноманіття та складність хімічної структури.

Поліфеноли є вторинними метаболітам рослин та постійними компонентами їжі рослинного походження, що характеризуються наявністю усвоїй структурі фенольних кілець. Феноли поділяють на декілька класів відповідно до кількості фенольних кілець, що вони включають, та елементів, що зв’язують їх між собой. Основними групами поліфенолів є: флавоноїди, фенольні кислоти, фенольні спирти, стільбени, лігніни та похідні поліфенольних сполук [70].

Природні поліфеноли характеризуються як потужні гастропротектори, спазмолітики, анти-секреторні, анти-діарейні та проти виразкові агенти [46]. Так поліфенольні сполуки оливкової олії та індійського агрусу є ефективними гастропротекторами проти НПЗП-індукованого ураження СОШ за рахунок антигістамінної активності, а також інгібуючої регуляції прозапальних цитокінів [71].

Повідомлялося, про антацидний та анти-секреторний ефект опосередкований зниженням активності Н+, К+-АТФази і антигістамінним ефектом поліфенольних сполук, поряд з посиленням синтезу захисних агентів СОШ (муцину і гексозаміну) [17], [20]. Так, алілпірокатехол фенольний компонент, що міститься в перці, запобігає індометацин-індукованому ураженню СОШ і сприяють загоєнню виразки шляхом підвищення секреції бікарбонатів і слизу, а також прискоренню ангіогенезу і кровотоку слизових оболонок за рахунок підвищення концентрації судинно-ендотелілального фактора (VEGF) і фактора Віллебранда, а також за рахунок інгібування ендостатину [72].

Зявляється все більше доказів, що підтверджують сильний терапевтичний потенціал поліфенолів нашої дієти на розвиток інфекції *H. Pylori* та хвороб, що з нею пов'язані [73], [74]. Терапевтичний ефект опосередкований через пригнічення активності життєво важливих ферментів цього патогенна, таких як уреаза і шикімат-дегідрогеназа, запобігаючи його адгезії і вакуолізації у тканинах шлунку[19].

Оксидативний стрес відіграє важливу роль в процесі ульцерогенезу. Дослідниками відмічено здатність поліфенолів зменшувати пошкодження слизових оболонок окисного ґенезу, шляхом зв’язування вільних радикалів, опосередковану активацією ензиматичних та не ензиматичних антиоксидантних агентів організму (каталази та супероксиддисмутази), а також інгібуючи активність генераторів активних форм кисню (ксантин оксидази та мієлопероксидази) [15], [18]. Захисний потенціал екстракту флавоноїдів (проантоціанідіну) винограду проти вільно-радикального окиснення ліпідів

тканин і окиснення білків значно вище, ніж вітаміну Е, вітаміну С, В-каротину, і поєднання вітамінів С і Е [75] Поліфенольні сполуки індійського агрусу чинять регулюючий вплив на трансмембранний потенціал мітохондрій, та активність мітохондріальної дегідрогенази, регулюючи мітохондріальну продукцію активних форм кисню дихальним ланцюгом[71]. Як було зазначено вище, вплив стрес маркерів (глюкокортикоїдів) зменшує продукці простагландинів, що на ряду зі зменшенням запального ефекту чинить деструктивний вплив на СОШ. Поліфенольний комплекс галлової кислоти чинить активуючий вплив на ЦОГ-залежний каскад чим підвищує продукцію простагландинів, що веде до підвищення продукції слизу шлунку [76]. Введення біологічно активних компонентів виноградних кісточок протягом 2 тижнів справляє захисний вплив проти ВХ, викликаної стресом (водно-іммобілізайний стрес) і значне зниження секреції соматостатину, гастрину і гістаміну [77].

Крім того, гастропротекторний вплив фітоекстракту поліфенольного коплексу (галлової кислоти) інгібувався введенням неселективного інгібітора NO-синтази, що вказує на те, що поліфенольні сполуки здатні підвищувати рівень eNOS-похідного оксиду азату (NO), що грає вирішальну роль у боротьбі з виразковою хворобою [78].

Отже поліфеноли проявляють гастропротекторний вплив на основні ідукуючі ланки сучасної ВХ (стрес, *H. pylori*, НПЗП). На сьогодні особливу увагу дослідники приділяють похідним поліфенольних сполук, а саме меланінам. Рослинні пігменти флавоноїди, і меланіни у тварин характеризуються спільними властивостями такими як: потужний захист від УФ-опромінення, а також нейтралізація АФК, що виникають під час окисного стресу як екзо- так і ендогенної природи [79]. Метаболічні шляхи меланінів та флавоноїдів відображають комплексну мережу за участю широкого спектра схожих біологічних подразників, біохімічних реакцій і генетичних взаємодій. За умов дії стресових умов таких як посуха, низька температура, токсичність металу і атаки патогенів біосинтетичні гени флавоноїдів рослин активуються,

при цому рівень флавоноїдів зростає[80], [81]. Схожа реакція спостерігається у тварин. За умов дії стресогенних факторів рівень меланоцит стимулюючого гормону (МСГ) та меланін-концентруючого гормону (МКГ) зростає. Так показано, що підвищення рівня МКГ пливає на вивільнення кортизола в ряді видів риб таким чином знижуючи рівень стресу у тварин [82], [83]. Звертає на себе увагу, антиоксидантні механізми які є ідеальним прикладом схожості механізмів дії цих сполук. Меланіни і флавоноїди здатні зв’язувати метали перехідних валентностей, що дозволяє вимикати ланцюги вільно радикальних процесів.[84], [85].

Синтез, меланінів, як і флавоноїдів починається з фенілаланіну. Завдяки своїй структурній подібності меланіну, флавоноїди визнаються в якості кофакторів, або субстратів для ключового ферменту біосинтезу меланіну тирозинази. Деякі флавоноли, такі як кемпферол та кверцетин, що володіють 3-гідрокси-4-кето фрагментом, аналогічному дігідроксіфеніловій групі в L-ДОФА, можуть конкурентно інгібувати активність тирозинази через їх здатность хелатувати мідь в активному центрі ферменту[86]. Ці дані свідчать про можливу конкуренцію при сумісному синтезі, що знову вказує на значну схожість у властивостях цих двох типів пігментів, їх здатність зв'язувати однакові субстрати і однакову роль у двох різних царствах[79]. Зважаючи на потужну стреспротекторну, антибактеріальну та протиазапальну дію меланінів на фоні низької вартості їх синтезу робить ці пігменти стратегічними гастропротекторними сполуками та альтернативою сучасним антивиразковим лікарським засобам.

1.4 Класифікація та синтез меланінів

Меланін – пігмент, що наявний в усіх царствах живих організмів на Землі [87]. Наявність його у викопних рештках перших живих істот на землі робить його новим біомаркером в еволюції життя [88], [89]. Назва "меланін" походить

від давньогрецького *melanos*, що означає "темний". Цей термін вперше застосовується шведським хіміком Берцеліусом в 1840 році, щоб охарактеризувати темний пігмент, отриманий з мембран ока [87].

Термін меланіни позначає пігменти різноманітної структури та походження, отриманих в результаті окислення і полімеризації замінної амінокислоти тирозину в людини та тварин або фенольних сполук в рослинах та бактеріях [23]. В залежності від їх джерела походження виділяють принаймні, п'ять основних типів меланінів: тваринний, рослинни, грибний, бактеріальний та синтетичний меланін. Більш предметне вивчення структури, шляхів синтезу та властивостей меланіну з різних джерел генерувало більш конкретну класифікацію за типом меланіну, що включає еумеланіни, феомеланіни, нейромеланіни, алломеланіни та піомеланіни, але кореляція між джерелом і типом меланіну не завжди чітка [87].

Синтез меланіну є цитотоксичним процесом через АФК, які генеруються в процесі його формування і полімеризації. Через це його синтез відбувається в спеціальних клітинних та субклітинних компартментах. Таким чином шкірний меланін у людини та тварин синтезується в меланоцитах, спеціалізованих клітинах, які знаходяться в базальному шарі між дермою та епідермісом. Волосяні цибулини мають фолікулярні меланоцити для трансферу меланіну у волосся. Як правило, людська шкіра має від 1000 до 2000 меланоцитів на мм^2, що складають близько 2-3% від загальної кількості епідермальних клітин [90]. Хоча всі раси людей володіють аналогічною концентрація меланоцитів в шкірі, рівні експресії генів, пов'язаних з меланіногенезом у різних етнічних груп, розрізняються, що в свою чергу впливає на тон шкіри. Синтез меланіну знаходиться під гормональним контролем. Головним регулятором меланогенезу є α-меланоцит стимулюючий гормон (α-МСГ), що синтезується з проопіомеланокортину (ПОМК) у проміжній долі гіпофіза [58], [91]. Меланоцити, взаємодіючи з α-МСГ, або АКТГ через меланокортиновий рецептор (MC1R), синтезують меланін в спеціальних ~ 30-нанометрових органелах під назвою меланосоми [92], [93]. Синтезований пігмент рухається

вздовж рукоподібних виростів меланоцитів, подібних дендритам, в напрямку епітеліальних клітин кератиноцитів. У людини, один меланоцит передає меланосоми близько 30 оточуючим кератиноцитам, утворюючи меланоепідермальний блок [94]. Поверхня інтактної меланосоми відіграє ключову роль в зв'язуванні катіонів металів та визначає його функціональну здатність інгібувати окислювальний стрес та дію АФК[95], [96]. Так само, меланосоми формуються і депонуються всередині меланофор рептилій, амфібій і риб[97]. Еумеланіни та феомеланіни - дві великі групи тваринних меланінів. Обидва типи синтезуються з амінокислоти L-тирозину за участю тирозинази, ключового ферменту меланогенеза у тварин і багатьох мікроорганізмів. Таким чином, L-тирозин можна вважати основним моно фенольним попередником меланіну [87].

Еумеланін характерний для всіх царств живих організмів. Феомеланін є характерним для вищіх савців та рептилій [98], [99]. Єумеланіни є підгрупа меланіну чорно-коричневого кольору, що синтезуються завдяки полімеризації L-ДОФА через 5,6-дігідроксиіндольний шлях. Феомеланіни це жовто-червона підгрупа меланінових пігментів, що синтезуються окисленням попередників цистеініл-ДОФА через бензотіазін та бензотіазоловий шлях. Головною відмінністю в структурі феомеланіну є наявність хімічного елемента сірки [24]. Основним місцем локазілації меланіну савців є шкіра та волосся. Пігмент також присутній в тканинах, що лежать в основі райдужної оболонки ока, вічок та сітківки[100], а також структурах внутрішнього вуха [101]. Меланін також міститься в деяких областях головного мозку, а також наднирниках савців.

Нейромланіни – темний полімерний пігмент, що синтезується специфічними популяціями катехоламінергічних нейронів головного мозку розташованих, в основному, в чорній речовині (*substantia nigra*) середнього мозку, а також блакитній плямі (*locuscoeruleus*) ретикулярної формації, хоча і в меншій пропорції. Припускається його важлива роль в запобіганні нейродегенеративних процессів, а також попередження пов’язаної з ними хворобою Паркінсона [102], [103].

Окрім вище вказаних місць розташування у савців показані ектопічні формування меланіну в жировій тканині[104]. Припускають, що він відіграє компенсаторну роль, що пов'язано з його властивостями інгібувати оксидативне ураження, а також запальні процеси в жировій тканині.

Алломеланін - представляє темно коричневий, або чорний рослинний пігмент, на відміну від інших меланінів, позбавлений азоту. Метаболізм рослин характеризується принципом економії азоту, так як цей елемент є важливим чинником, що лімітує рослинний ріст. Деякі овочі, в якості попередників меланінів, використовують тільки нормальні катехоли, а інші використовують різні катехолові кислоти (такі як кавову, хлорогенову або галову кислоти), що є поліфенольними комплексами, які представляють потужні антиоксидантні властивості [46].

Великий інтерес дослідників проявлений до синтезу та властивостей грибкових меланінів. Меланінові пігменти дуже поширені у грибів. Меланогенез зв'язаний з критичними періодами життя грибів (розвиток міцелія, споруляції, захисна реакця на фактори ураження). Грибкові меланін локалізуються переважно в клітинній стінці, а не в спеціалізованих субклітинних органелах, таких як тваринні меланосоми, що також свідчить на користь бар'єрної функції меланіну проте в разі грибкової інфекції меланін виступає в ролі патогенного фактора [105]. Цікавою властивістю грибів є синтез піомеланінів, який починається з L-тирзину через гомогентизинову кислоту, а також синтез *Aspergillus nidulans* ДОФА-меланіну [106]. Бактерії можуть синтезувати, як еумеланін [107] так і алломеланіни[108] і ДГН меланін [87].

Кристалічну структуру еумеланіну важко визначити, що обумовлено низькою розчинністю даної сполуки. Будь-яка хімічна обробка для розчинення еумеланіну призводить до змін нативної структури вихідного полімеру і ламає її у вигляді фрагментів, в той час як ферментативне розщеплення видаляє вміст білка і ліпідів природного зразка [87]. За інтернетджерелами молекулярна формула визначається як $C_{18}H_{10}O_4N_2$ з систематичним ім'ям 3,8-диметил-2,7-

дигідробензо[1,7]ізоіндоло[6,5,4] індол-4,5,9,10-тетрон [109]. В даний час відповідно до більшості експериментальних даних, основними будівельними блоками меланіну є 5,6-дігідроксііндол одиниці (ДГІ)[110].

На базі хімічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка, Пермякова та ін.. було вивчено хімічну структура продукту життєдіяльності чорних дріжджів "Nadsoniella nigra sp. X-1 "[111]. Методом 1H ЯМР спектроскопії встановлено наявність в молекулах меланіну ароматичних кілець індолу, фенольних гідроксильних груп і невеликої кількості ефірних груп (-OCOCH3), утворених з аналогічних карбоксильних. У твердому зразку меланіну методом FTIR-спектроскопії показано присутність заряджених аміно (> NH2 +) і карбоксильних (-COO-) груп, що свідчить про цвіттер-іонний характер його макромолекул. Цей метод також вказує на численні водневі зв'язку, утворені між гідроксильними і карбоксильними групами меланіну.

1.4.1 Біологічна роль і функції меланінів

Колір шкіри і волосся є важливою фенотиповою особливістю людини, що в значній мірі пов’язана з біосинтезом меланіну. Захист шкіри від сонячного випромінювання, мабуть, одна з найбільш важливих біологічних функцій меланінових пігментів[112].На сьогодні доведено, що високий рівень конститутивної пігментації знижує чутливість до шкідливих ефектів ультрафіолетового (УФ)-випромінювання. Так у людей з білою шкірою шанс захворіти на рак шкіри, приблизно, в 70 разів вище ніж у людей з чорною шкірою [113]. Меланін забезпечує фотозахист проти УФ-індукованого пошкодження ядерної ДНК шляхом екранування ядер над'ядерною шапкою меланоцитів і кератиноцитів [114]. Абсорбовані фотони перетворюються в фото-коливальну енергію, що розсіється без шкоди для організму[115]. Важливо відмітити, що в темній шкірі меланосоми стійкі до деградації лізосомальними ферментами, утворюють над'ядерні шапки з кератиноцитів і

меланоцитів. На противагу цьому, в ледь пігментованій шкіри, меланосомами деградують і зберігаються як "меланіновий пил" в супрабазальних шарах. Це вважається важливим фактором у процесі канцерогенезу, оскільки він ставить під загрозу фотозахист шкіри[79].

Важливою властивістю еумеланіну є зв'язування вільних радикалів, а також антиоксидантна дія завдяки трансферу атому водню для стабілізації вільних радикалів [116]. Також дослідження in vitro показали, що меланін володіє потужною акцепторною здатністю по відношенню до гідроксильних радикалів у реакції Фентона[117].

Синтез нейромеланіну (НМ) в НМ-нейронах, зосереджених переважно в чорній субстанції і блакитній плямі головного мозку, сам по собі є захисним механізмом що спрямований на поглинання надмірної кількості цитозольних хінонів і семіхінонов в неактивній формі, тим самим блокуючи їх цитотоксичність [118]. Крім того, групи дигідроксиіндолу, що входять до складу пігменту здатні зв'язувати іони тривалентного заліза, які полегшують утворення гідроксильних радикалів[119]

Arun et al. 2015 було показано, що меланін ізольований з грибів *Schizophyllum commune* проявляв антибіотичний ефект проти бактеріальної культури *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus sp*, та *Pseudomonas fluorescens*, а також дерматофітних грибів *Trichophyton simii* та *T. Rubrum*[27]. Що є перспективним засобом у боротьбі *H. Pylori* -асоційованої виразкової хвороби. Антихелікобактерна терапія, зазвичай реалізується за допомогою комбінації кислото-інгібуючої терапії (інгібітори протонної помпи (ІПП), H_2 блокатири), та антибіотиків (кларитроміцин, метронідазол, амоксіцилін)[120]. Показано, що *H. Pylori* може бути стійкою до будь-якого з цих препаратів, що призводить до зниження ерадикації [47]. Показано, що меланіни клітинної стінки *Phellinus weirii* або з культуральної середовища актиноміцетів є ефективним антибіотиком [27]. Що стосується попередників меланіну то було встановлено, що катехол, 5,6-дигідроксиіндол і 1,8-дігідроксінафтален самостійно проявляють властивості антибіотиків широкого спектру дії[121].

Стандартне інгібування секреції соляної кислоти, що має важливе значення для стабільності антибіотиків, а також захисту СОШ, окрім багатьох побічних ефектів може призвести до колонізації СОШ іншою бактеріальною флорою, вірусами та навіть грибами[122]. В свою чергу Савицьким та співав. було показано, пероральне введення меланіну гальмувало стимульовану гістаміном секрецію соляної кислоти в шлунку щурів. Автори припускають, що механізм дії меланіну може бути пов'язаний з блокуванням H_2-гістамінових рецепторів розташованих на парієтальних клітинах шлунку[25]. Наведені результати вказують на гіпосекреторну та антибактеріальну дію меланіну, що є ключовими профілактичними засобами *H.pylori* та НПЗП-асоційованого ураження шлунку.

Як було зазначено раніше, стрес є ключовим прогностичним фактором виникнення виразкової хвороби асоційованої з *H. pylori,* НПЗП, курінням та низьким соціоекономічним статусом [13], [48].Стресогени різної природи (спека або холод, вимушена іммобілізація або фізичні вправи; хімічні, біологічні та психологічні агенти) завжди викликають однакову відповідь організму, яка полягає у активації ГГН вісі та виділення нейропептидів АКТГ, α-МСГ і β-ендорфіну[58], [123]. Важливо відмітити, що вдповідь на стрес фактори завжди асоційована з активацією меланогенезу. Так α-МСГ, є одним з основних факторів підвищенного синтезу меланіну. Зростання секреції адренокортикотропного гормону (АКТГ) гіпофізом, у відповідь на стрес, призводить до підвищеного вивільнення основних біомаркерів стрес-реакції глюкокортикоїдів (кортизол) через МС2 рецептори, тоді як через МС1 рецептори стимулює виділеня меланіну [60], [23]. В роботі Чижанської та спів. 2008 було показано, що моделювання соціального стресу призводило до статистично значущого зростання концентрації кортизолу в сироватці крові тоді як у групі тварин яким вводили меланін, рівень кортизолу був в 1,8 рази меншим[32]. Дійсно Carletti et al. 2014 було показно, що рівень кортизолу у тварин одного виду, що володіють більшою пігментацією, є значно нижчим за умов дії стресу [79].

Як було зазначено вище, дисбаланс глюкокортикоїдів відповідальний за ураження слизової оболонки шлунку, що включає інгібування синтезу шлункового слизу, посилення виділення гастрину і посиленням секреції кислоти[61]. Регуляція синтезу глюкококортикоїдів здійснюється шляхом активації імунної системи і цитокін-сигнальних структур [57]. Значну роль в даній регуляції відводять рецепторам активації проліферації пероксисом (PPARs), які здатні на рівні транскрипції регулювати синтез та кількість прозапальних цитокінів [124]. Дослідження гастропротектоної функції меланіну на фоні введення незворотного селективного агоніста PPARγ GW9662 перед нанесенням стресу показало, що у групі профілактичного введення меланіну площа виразок, довжина ерозій та кількість крововиливів була значущо менша в порівнянні з групою контролю. Застосування GW9662 блокатора, як за умов введення плацебо так і введення меланіну, призводило до значущіх ерозивно-виразкових уражень та крововиливів шлунку. Автори припускають, що протективна дія меланіну на ураження СОШ, може бути частково або повністю пов'язана з регуляцією активності PPARγ [32].

Мікроциркуляторне русло також лежить в основі захисту шлунку. Воно має важливе значення для доставки кисню і поживних речовин, а також видалення токсичних речовин та продуктів обміну клітин [125]. Ендотеліальні клітини, що вистилають мікросудини генерують потужні вазодилататори, такі як оксид азоту (NO) і простацикліни (PGI 2), які захищають слизову оболонку шлунку від уражень і протистоять вазоконстрикторному ефекту лейкотриєнів (C_4), тромбоксанів (A_2)і ендотелінів. PGI2 і NO підтримують життєздатність ендотеліальних клітин і запобігають адгезії тромбоцитів і лейкоцитів до мікросудинних ендотеліальних клітин, що запобігає погіршенню мікроцеркуляції[125]. Чижанською та співав. 2005 було показано, що аналіз імуноблотингу тотального екстракту клітин слизовової оболонки шлунку щурів виявив чітку експресію ферменту відповідального за синтез синтази оксиду азоту eNOS[126]. Дослідниками було показано, що рівень експресії ферменту eNOS при введенні меланіну зростав на 47% у порівнянні з інтактними щурами.

Було висловлено припущення, що протективна дія меланіну в умовах ураження СОШ частково або повністю асоційована з активацією PPARγ, які можуть впливати на зростання рівня NO. Проте питання про можливі посередники впливу меланіну або безпосередність його впливу на активацію PPARγ, а також регуляцію цитокін-сигнальної системи та запуск центральної ГГН-стрес осі залишається недослідженими.

1.4.2. Перспективи використання меланіну, як наносполуки

Наявність неспарених електронів в структурі меланіну є однією з ключових особливості пігменту, яка визначає його основні фізико-хімічні властивості.

Показано схожість між структурним і оптичним властивостями еумеланінів і вуглецевими матеріали, що широко використовується в нанобіології [127]. Так, за результататами електронної мікроскопії, як природні так і синтетичні меланіни можуть самостійно збиратися в багатошарові стопкові структури, що обумовлено гетероароматичною нековалентною взаємодією основних структурних блоків пігменту [128]. Хімічна невпорядкованість структури меланіну, що обумовлена перехресним з'єднанням дигідроксиіндольних кілець, лежить в основі сучасної моделі меланіну, яка пояснює підвищену агрегаційну здатність еумеланінових біополімерів [129]. З цим може бути пов'язана здатність зв'язувати цілий ряд лікарських засобів, таких як метотрексат, хлорпромазин, кокаїн, амфетаміни, донарубіцин, хінідин, дизопірамід та метопролол[130].

Наночастинки меланіну все частіше експлуатуються для біомедичного застосування. Потужні універсальні адгезійні властивості, біосумісність, pH-регульована селективна проникність для катіонних і аніонних редокс-активних молекул, дозволяються використовувати меланін у якості полідопамінових

(ПДА) покриттів, які використовуються в біоінженерії, наномедицині, функціоналізації наночастинок, доставки лікарських засобів, а також взаємодія з клітинами [131]–[133]. ПДА є синетичним аналогом пігменту природного походження еумеланіну. Йому притаманні основні фізико-хімічні властивості меланінів, а найголовніше біосумісність з тканинами організму [133].

Наночастинки золота (Au), інкапсульовані в монодисперсні гібридні наносфери попередника меланіну L-DOPA (Au@DOPA), мають не тільки однорідний розмір і унікальні оптичні властивості, а й хорошу біосумісність. Було показано, що Au@DOPA наносфери поглинаються судинами гладких м'язів людини і клітинами раку молочної залози, а отже, можуть діяти в якості нового оптичного контраст-реагенту при візуалізації пухлинних клітин шляхом конфокальної лазерної скануючої мікроскопії і оптичної мікроскопії[23], [134]. Також було показано, що наночастинки меланіну, отримані за допомогою ферментативної полімеризації діоксиду кремнію, забезпечували ефективний захист кісткового мозку від радіо токсичної дії під час радіоімунотерапії і в деяких випадках зовнішніпроменевої терапії, що дозволяє, за необхідності, збільшувати дози хіміотерапії [135].

Наночастинки меланіну, також були запропоновані в якості нанотранспортера лікарських засобів в pH-змінних середовищах шлунку та кишечника [136]. Морфологія меланіну ідеально підходить для судинної і шлунково-кишкової доставки лікарських засобів, яка зазвичай потребує розмірів частинок 100-300 нм[136]–[138]. Крім того, його кругла форма сприяють захопленню його клітинами через ендоцитоз [136], [139]. Ці параметри позитивно впливають на вивільнення лікарського засобу, починаючи з транспортування і біорозподілу частинок на судинному рівні, і закінчуючи адгезією і інтерналізацію на клітинному рівні [140].

Схожими властивостями в сучасному світі володіють наночастинки оксидів металів (особливо рідкоземельних РЗМ), що у своїй більшості проявляють антиоксидантну, фотопротекторну, протипухлинну та ферментативну дію за умов різних патологій [29], [141]. Проте в літератрі

відсутні дані про порівняння впливу даних сполук в якості комплексних засобів проти дії стресу на організм.

1.5. Біологічна роль і функції нанокристалічного діоксиду церію

Церій (Ce) являє собою рідкоземельний елемент з атомарним номером 58, який належить до класу лантаноїдів періодичної таблиці. Церій є найбільш поширеним рідкоземельним металом унікальність якого полягає в тому, що він може перебувати в двох станах окислення, як +3 (Ce^{3+}) так і +4 (Ce^{4+}), на відміну від більшості інших рідкоземельних металів, які в основному існують в трьохвалентному стані [142]. Самостійно церій не несе біологічного значення в фізіології ссавців, але розчинні солі Ce^{3+} (нітрат, ацетат, хлорид і т.д.) використовуються людьми в біомедичних цілях через їх протинудотну, бактеріостатичну, бактерицидну, імуномодулюючу та протипухлинну дію [143]–[145]. Нерозчинна форма оксиду церію (оксид церію, CeO_2) існує не тільки в природі, але також синтезується синтетично в формі наночастинок.

НДЦ, широко застосовуються в хімічній промисловості, а саме: механічному поліруванні і засобах шліфувальня [146], в основі покриттів для захисту від корозії металів і сплавів [147], а також в каталізі окислення дизельного палива [148]. Останнім часом спостерігається вибух фундаментального і практичного інтересу в області розробки і застосування НДЦ в якості потенційних каталітичних антиоксидантів в біології та медицині [149]. НДЦ демонструє антиоксидантну ензимо-міметичну активність, а також володіє здатністю зв’язувати активні форми кисню (АФК) і реактивні форми азоту (РФА). В основі ензимо-міметичної та АФК/РФА зв’язуючої активності НДЦ лежить фізико-хімічні властивості нанорозмірних матеріалів, такі як здатність НДЦ поглинати та віддавати кисень[150] завдяки окисному переходу між Ce^{3+} і Ce^{4+} станами на поверхні НДЦ[151]. Оксид церію може існувати у вигляді чистого CeO_2 (Ce^{4+}) або Ce_2O_3 (Ce^{3+}). Проте, в наноформі, оксид церію

містить суміш обох Ce4 + і Ce3 + на поверхні НДЦ[152]. При зменшенні абсолютного діаметра НДЦ (наприклад від 20 нм до 2 нм), показана співрозмірна втрата атомів кисню і збільшення числа Ce^{3+} ділянки на поверхні наночастинок[146], [153], [154]. Таким чином, втрата атомів кисню на поверхні НДЦ, супроводжується зменшенням ступеня окислення Ce ($Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+}$) і збільшенням кількості кисневих вакансій на поверхні НДЦ.Доведено, що саме окисно-відновна пара (Ce^{3+} / Ce^{4+}), є основним місцем локалізації антиоксидантних властивостей НДЦ [146].

1.5.1 Фізикохімічні властивості НДЦ та показники токсичності

На сьогоднішній день встановлено, що наночастинки (НЧ) здатні чинити негативний вплив на органи і тканини, в тому числі на клітинному і субклітинному рівні, внаслідок притаманних їм незвичайних фізико-хімічних властивостей, включаючи малі розміри, велику питому поверхню, високу реакційну здатність, особливості електронної будови, високу розчинність, здатність до агрегації і, в окремих випадках, специфічне формування [155].

З точки зору токсичності для діоксиду церію існує кілька розмірних діапазонів. Крупнокристалічний CeO_2 з розміром частинок > 100 нм має слабку токсичність, яка практично не залежить від його дисперсності. Зі зменшенням розміру частинок CeO_2 до 50-30 нм їх токсичність незначно зростає. Даний зріст аналогічний загальній закономірності, характерній практично для всіх наноматеріалів: він пов'язаний зі збільшенням питомої вільної поверхні частинок і, відповідно, зі збільшенням швидкості різних гетерофазних процесів (в тому числі процесів адсорбції і каталізу) на поверхні. Діапазон 30-10 нм представляє діапазон, де виявляються і посилюються ефекти, пов'язані з властивостями частинок CeO_2 брати участь в окисно-відновних процесах,

причому такі наночастки діоксиду церію виступають переважно в ролі окислювача, викликаючи окисний стрес [156]. При подальшому зменшенні розмірів наночастинок їх токсичність знову знижується. Імовірно, даний факт пов'язаний з різким збільшенням кисневої нестехіометрії частинок. Зниження токсичності наночастинок CeO_2 і зростання антиоксидантної (відновних) активності триває аж до субнанометрових розмірів[157].

Авторами було встановлено значення напівлетальної дози LD50≥ 2000мг / кг (що практично відповідає токсичності кухонної солі) і показано відсутність різниці в біологічних і гістологічних характеристиках дослідних (які одержували наночастинки) і контрольних тварин[158].

Використовувані при синтезі наночастинок діоксиду церію ліганди (стабілізатори) самі по собі можуть мати певну біологічну активність і навіть виявляти цитотоксичність. Так, якщо стабілізатором і прекурсором при отриманні та вивченні токсичності наночастинок діоксиду церію виступав гексаметілентетрамін [159] – ця сполука в водному розчині повільно гідролізує з виділенням високотоксичного формальдегіду, який сам по собі є сильним біоцидом. Отже результати біолюмінесцентного методу (Microtox®), заснованого на гасінні люмінісценції бактерій Vibrio fischeri в присутності токсичних сполук буде некоректним. З іншого боку використання стабілізатора CeO_2 цитрату амонію, призводили, навпаки, до збільшення (до 40%) інтенсивності біолюмінесценції аналогічного штаму *V. fisheri*, тобто діоксид церію чинив стимулюючий вплив на тест-культуру [160].

Дзета-потенціал частинок багато в чому визначає їх поведінку, в тому числі - стійкість при певних значеннях pH, здатність сорбуватися на тих чи інших межах розділу і проникати через мембрани. Зразки частинок, що мають позитивний дзета-потенціал, краще адсорбували протеїни, в той час як негативно заряджені частинки або сорбують набагато менше альбуміну, або взагалі не проявляють сорбційної активності. З іншого боку, слід враховувати, що негативно заряджені частинки легше поглинаються клітиною [161]. Як

виявилося, частки з позитивним (стабілізатор амінована поліакрилова кислота) і нейтральним зарядом (стабілізатор декстран) здатні проникати в більшість вивчених типів клітин, частки з негативним зарядом (стабілізатор цитрат натрія, полі акрилова кислота) переважно в малігнізовані лінії клітин. При цьому якщо незаряджені частки концентруються переважно в цитоплазмі, то заряджені здатні проникати в лізосоми. Таким чином, частки з позитивним зарядом мають максимальную токсичність, незаряджені - мінімальну токсичність для всіх вивчених типів нормальних клітин, а частинки з негативним зарядом поверхні малотоксичні для нормальних і токсичні для ракових клітин [162].

При порівняння механізмів токсічної дії оксидів цинку, титану і церію з урахуванням їх розчинності здатності індукувати окислювальний стрес на культурах клітин RAW 264.7 (клітинна лінія фагоцитозу) і BEAS-2B (епітеліальні клітини бронхів людини) було встановлено, що препарати діоксіда церію і титану, на відміну від оксиду цинку, не є токсичними для обох клітинних культур. Більше того, якщо ночастики TiO_2 выступали в ролі просто інертного матеріала, то для наночасток CeO_2 була встановлена здатність захищати клітини відекзогенних активних форм кисню (H_2O_2 и O_2^-)[163].

Вивчено вплив способу введення наночастинок CeO_2 на їх біорозподіл в організмі мишей in vivo [164]. Частинки вводили перорально (ПО), внутрішньовенно (ВВ) та інтраперітонеально (ІП). Найбільше накопичення НДЦ спостерігалося при ВВ та ВП способах введення (в селезінці, далі - в печінці, легенях і нирках). Виведення з усіх органів відбувалося з калом. Введення наночасток діоксиду церію не показало токсичності, при ВВ та ВП індекси лейкоцитарної формули були незначно підвищені. В той же час введення наночастинок CeO_2 знижувало токсичну дію CCl_4 і зменшувало окислювальний стрес - подібно дії традиційного антиоксиданту N-ацетил цистеїну.

1.5.2 Накопичення та виведення нанокристалічного діоксиду церію в організмі

При введенні хлориду або цитрату церію (III) накопичення церію спостерігається в основному в печінці і скелеті . У разі перорального введення істотна частина солей церію засвоюється в кишечнику і потім виводиться з жовчю [165]. Період напіввиведення хлориду церію (III) може досягати кількох років [166], тоді як цитратні комплекси РЗЕ виводяться з організму за кілька годин [167]. Слід відмітити, що введення в організм комплексонатів металів (наприклад, діетилентріамінпентаацетатів кальцію або цинку) сприяє швидкому виведенню церію з організму і може бути використано для відповідної детоксикації [156]. При внутрішньовенному введенні мишам, за допомогою конфокальної мікроскопії, наночастинки діоксиду церію розміром 10 нм функціоналізували флуоресцеїн ізотіоціанатом. Найбільше кількість наночастинок накопичувалося в печінці і селезінці, деяка частина депонувалася в легенях і нирках. Проте цілком помітну кількість наночастинок CeO_2 проникало в паренхіму головного мозку і активувало астроцити[168].

1.5.3 Механізм антиоксидантної ензимо-міметичної активності НДЦ

Окисний стрес є основою багатьох серйозних захворювань і однією з його основних характеристик є клітинний дисбаланс між ендогенним антиоксидантним захистом (зв'язування вільних радикалів за допомогою антиоксидантів / або окисно-відновних ферментів) і АФК (наприклад, супероксид-аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$); перекис водню (H_2O_2); гідроксильний радикал (·OH)) що генеруються всередині клітин. У клітинному середовищі $O_2^{\cdot-}$ діє в

якості сигнальної молекули і утворюється в результаті нормального клітинного метаболізму. Проте рівень $O_2^{\cdot-}$ може швидко збільшуватись за рахунок активації NADPH оксидази під час запальних реакцій і/або порушення мітохондріального електронтранспортного ланцюга і перешкоджанню продукції АТФ. Токсичні ефекти від надлишку $O_2^{\cdot-}$, як правило, контролюються і корегуються за рахунок активності ферменту супероксиддисмутази (СОД) [169], розташованої позаклітинно, а також в цитоплазмі і мітохондріях. СОД усуває вплив $O_2^{\cdot-}$ шляхом перетворення $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 і O_2 за допомогою двоступеневої каталітичної реакції дисмутації [146].Аналогічним чином, описується каталітичний механізм, за допомогою якого НДЦ утилізує $O_2^{\cdot-}$[147].

Korsvik et al. першими продемонструвати СОД-міметичну активність НДЦ[28]. Автори вимірювали генерацію H_2O_2 з каталітичного розкладання $O_2^{\cdot-}$ за допомогою НДЦ. Основний висновок цього дослідження полягав в тому, що НДЦ з високим Ce^{3+}/Ce^{4+} співвідношенням (з вищім рівнем Ce^{3+} на поверхні) були більш ефективними поглиначами $O_2^{\cdot-}$ ніж НДЦ з низьким співвідношенням Ce^{3+}/Ce^{4+} (з вищім рівнем Ce^{4+} на поверхні) [170].

Високий рівень H_2O_2 вважається більш небезпечними для клітинного гомеостазу, ніж високий рівень $O_2^{\cdot-}$ через те, що H_2O_2 бере участь в генерації більш згубливого, $^{\cdot}OH$ через реакцію Фентона з металами. Каталаза, глутатіонпероксидаза і пероксиредоксини зменшують рівень H_2O_2 в клітинах, але каталаза (КАТ) є найбільш ефективним антиоксидантом ферментом, що перетворює H_2O_2 в O_2 і H_2O [171]. Rzigalinski et al. одними з перших продемонстрували КАТ-міметичну активність НДЦ на основі їх досліджень на зміни спектро-люмінесценції НДЦ в присутності H_2O_2 в культурі астроцитів[172]. Ключовою ідеєю цього дослідження було заключення про те що Ce^{4+} на поверхні НДЦ потрібні для розкладання H_2O_2. При цьому після розкладання перекису водню початковий спектро-люмінесценцентний рівень НДЦ повертався до своїх початкових значень; це свідчить про відновний характер окисно-відновної пари Ce^{3+}/Ce^{4+} на поверхні НДЦ. Іншими

науковцями було підтверджено КАТ-подібні властивості НДЦ. Було показано, що НДЦ з низьким коефіцієнтом Ce^{3+}/Ce^{4+} на поверхні функціонують як ефективні антиоксидантни з КАТ-міметичними властивостями[173].

1.5.4. Гастропротекторний вплив нанокристалічного діоксиду церію

Ураження органів травлення здатні ускладнювати й обтяжувати перебіг інших хвороб, що звертає увагу дослідників на боротьбу з хворобами органів травлення серед яких найбільший відсоток захворювань та повторних рецидивів припадає на виразкову хворобу шлунку [7], [41].

Сучасна фармакотерапевтична стратегія направлена на пригнічення кількох основних ланок що беруть участь патогенезі виразкової хвороби, таких як інфекційний ефект патогенної мікрофлори (*Helicobacter pylori*), оксидативний стрес та побічні ефекти гастропротекторних препаратів (в тому числі НПЗП) [13]. Проте комплексний підхід потребує пошук засобів, що проявляють комплекний гастропртекторний ефект.

Виявленобактеріостатичний ефект нітрату і інших солей церію (III), що швидко призвело до їх використання в якості шкірних антисептиків в медицині і ветеринарії [174]. В кінці 70-тих років минулого століття Sobek et al. 1968 р досліджували дію нітрату церію на морфологію і клітинні функції *Escherichia coli*[175]. Іони церію легко потрапляли в цитоплазму кишкової палички (на відміну від клітин ссавців), пригнічуючи при цьому клітинне дихання (поглинання кисню) і метаболізм глюкози. Клітинна оболонка в морфологічному плані залишалася інтактною, але при дослідженні з використанням електронної мікроскопії було виявлено, що на ній утворювались випинання ('knob-like protrusions'), які автори пов’язували з можливим руйнуванням мембрани [176].

На прикладі *E. coli* і *Synechocystis sp.* показано внесок механізмів токсичної дії наночасток діоксиду церію на мікроорганізми[177]. У разі «прямого» механізму (контакту з мембраною та порушення клітинного біслою мікроорганізму) важливу роль відіграють розміри частинок і фізико-хімічні характеристики золю CeO_2 (ζ-потенціал, агрегованість частинок і т.п.). Для ціанобактерій Synechocystis sp., коли наночастинка і мембрана відокремлені позаклітинними полімерними формуваннями (екзополісахариди), працює «непрямий» механізм токсичності НДЦ (генерація активних форм кисню при контакті з бактерією). При «непрямому» механізмі основну роль відіграють іони церію, що утворюються в процесі розчинення наночастинок, а також активні форми кисню, які утворюються на поверхні наночастинок і мігруючі через бактеріальну мембрану. Отже НДЦ проявляє антибактеріальну дію, що є актуальним в умовах виразкової хвороби інфекційного ґенезу.

ВХшлунку характеризується розривом слизової оболонки вкритим фіброзним нальотом по краю[42]. Розриви можуть бути викликані за рахунок втрати полярності клітинами та порушенням міжклітинних зв’язків ослаблених ділянок СОШ та ДПК[178]. Транслокація факторів вірулентності *H. pylori* з одної сторони, а також гіперсекреція соляної кислоти та ушкодження цілісності слизового бар’єрушлунку на фоні екзогенних стрес-факторів з іншої, призводять до ослаблення та виникнення зон запалення СОШ [179]. За даних умов показано актуальність застосуванням нанокристалічногодіоксиду церію [180]. Варіанти застосування наночасток включають: по-переше захист від генерації вільних радикалів і АФК, що формуються за умов запалення, по-друге функцію підкладки, що виконує роль позаклітинної матриці, що забезпечує біоактивне середовище для нейрорегенерації, по-третє можливість транспортування лікарських засобів до зони ураження .

Як було зазначено *H. Pylori*, або НПЗП асоційоване запалення, що супроводжується інфільтрації переважно сегментоядерних нейтрофілів та лімфоцитів власною пластинкою (lamina propria) СОШ [178] підвищують

активність макрофагів, що здатні посилювати локальну запальну реакцію за рахунок вивільнення АФК, нітрозид-радикала, а також iNOS[181]. В роботі Hirstet al. 2009 вивчали вплив НДЦ на вміст АФК в нормальних і стимульованих ліпополісахаридом мишачих макрофагах J774A.1[182]. Показано, що після обробки діоксидом церію люмінесценція стимульованих макрофагів знаходилась на рівні нестимульованих. Схожий захисний ефект на ураженні тканини легень щурів показало лікування CeO_2 за умов моделювання пневмонії, що характеризувалося зменшення генерації АФК в крові та гомогенаті легень, а також зниженням експресії про-запальних цитокінів (TNF-α, IL-6 та CxCL2) [183]. Наведені результати свідчать про перспективи використання НДЦ в якості модифікатора імунної вдповіді за умов запалення СОШ.

Активність макрофагів призводить до запуску прозапальних цитокінів – що обумовлюють активацію центральної ланки реакції на подразнення, а саме гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової ГГН вісі, що підвищує синтез глюкокортикоїдів корою наднирників[57]. Відомо, що синтез глюкокортикоїдів асоціюється з підвищенням синтезу глюкози та інгібування гострого запального процесу [60]. Отже механізм реалізації імуносупресорних властивостей НДЦ може бути пов'язаний з впливом на центральну ГГН вісь, проте даний механізм потребує вивчення. Також залишається нерозкритим питання про вплив НДЦ на цитокін-сигнальну ланку, що є посередником у регуляції про- та антизапальної реакції організму.

Немає жодного захворювання шлунково-кишкового тракту (ШКТ), при якому не було б тих чи інших порушень моторно-евакуаторної функції стравоходу, шлунку, тонкої та товстої кишки[184]. Розлади моторики ШКТ можуть виступати первинним, провідним патогенетичним фактором таких станів, як функціональна диспепсія, гастроезофагеальна рефлюксна хвороба, дискінезія жовчовивідних шляхів, закрепи тощо, і бути наслідком цілої низки захворювань . Єфіменко та спів. 2014 було показано, що 10-ти денне введення

НДЦ збільшувало амплітуду скорочень, стимульованої карбахоліном моторики, шлунку і товстійкишки[184]. При цьому авторами було показано захисний вплив НДЦ на вікові зміни морфології товстого кишечника.

Отже використання НДЦ є перспективним засобом профілактики та лікування патологій шлунково-кишкового тракту, проте його роль, як потенційного стрес-протектора залишається недослідженою. Також, не було, провдено порівняння впливу на ураження в СОШ, викликаних стресом, НДЦ та природного аналога меланіну.

Отже, враховуючи вищевикладене, метою роботи було дослідити вплив меланіну та нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунку та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресувикликаного нервово-м’язовим напруженням за Сельє.

Для досягнення мети досліджень було поставлено такі завдання:

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

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

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

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

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

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Умови та схема проведених експериментів

Дослідження проведені на білих нелінійних щурах самках масою 120-150 грамів, з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року) та етичним комітетом Київського національного університету імені Тараса Шевченка, інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі[185].

Тварин утримували в умовах акредитованого віварію згідно зі "Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

2.1.1. Групи тварин з дослідження впливу меланіну за умов дії стресу

Щури були розділені на 3 групи.Щури першої групи слугували контролем (інтактні тварини). Щури другої групи були піддані евтаназії на стадії тривоги (2-х годинного стресу), їм перед нанесенням стресу внутрішньошлунково (в/ш)

вводили плацебо (0,5 мл води), щури третьої групи були піддані евтаназії на стадії тривоги, їм перед нанесенням стресу вводили меланін в дозі 5 мг/кг, розчинений в 0,5 мл води. Продуцентом меланіну, використаного в наших дослідженнях, є дріжджеподібні гриби Nadsoniella nigra штам X1, що були висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська Антарктична станція академік Вернадський).

2.1.2. Групи тварин з дослідження нанокристалічного діоксиду церію за умов дії стресу

Тварини були розділені на 3 групи по 10 у кожній. До 1 -ї групи ввійшли щури, яким вводили воду (інтактний контроль), до 2-ї – щури, яким вводили воду перед моделюванням стресу, до 3-ї – щури, яким перед моделюванням стресу вводили НДЦ в дозі 1 мг/кг, розведеного в стабілізуючому розчині об’ємом 2,9 мл/кг. Введення рідин, об’ємом 2,9 мл на щура, проводили внутрішньошлунково (per os) один раз на добу, упродовж 10 діб. На 10-ту добу стресові ураження викликали методом нервово-м’язового напруження за Сельє. Щурів іммобілізували протягом 3 год на операційному столику на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Через 2 год після припинення знерухомлення тварин умертвляли за допомогою цервікальної транслокації.

2.2. Метод нервово-м’язового напруження за Сельє

Стресові ураження в СОШ щурів викликали методом нервово-м’язового напруження за Сельє. Даний метод рекомендований Державним експертним центром МОЗ України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів[31].

За методикою щурів іммобілізували на операційному столику на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Тривалість іммобілізації складала 3 години. Іммобілізаційний стрес є стресом змішаного типу, тобто поєднує в собі елементи емоційного та фізичного стресу, що робить дану модель найбільш наближеною до природних умов. Через 2 години після дії стресу тварин умертвляли за допомогою цервікальної транслокації.

2.3. Забір біологічних зразків

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

Забір органів. Тимус і наднирники діставали, зважуючи. Коефіцієнт маси тимусу та надниркових залоз обчислювали за формулою: КМ = маса органа (мг) / маса тіла тварини (г) • 100 [31].

Забір крові у щурів. Для визначення вмісту кортизолу та АКТГ розрізали грудну клітку, відкривали доступ до серця, яке ще продовжувало скорочуватися, і за допомогою шприца набирали 3-5 мл крові. Кров щурів збирали в пробірки без гепарину, відстоювали і центрифугували при 1000 g 20 хв. Після чого здійснювали відбір сироватки крові.

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

Макроскопічний аналіз шлунку. Шлунок, розрізали по малій кривизні, вивертали слизовою назовні та промивали, на гастроскопі при

трансілюмінаційному освітленні за допомогою лупи (х4) проводили ретельний огляд СОШ. Диференційно підраховували площу виразок та довжину ерозій.

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

2.4. Визначення продуктів катаболізму білків слизової оболонки і пристінкового слизу шлунку

У гомогенаті СОШ визначали вміст вільних оксипроліну[188], фукози [189] і гексуронових кислот[190].

Визначення оксипроліну. Вміст вільного оксипроліну визначали методом Тетянец С.С.[188], який заснований на реакції пірол-2 карбонової кислоти, що утворюється при окисленні оксипроліну з парадиметиламінобензальдегідом. Концентрацію визначали за калібрувальним графіком і виражали в мкмоль/г.

В дослідні пробірки поміщали 0,1 мл гомогенату, а в контроль 0,1 мл дистильованої води. У всі пробірки додавали по 0,4 мл охолодженого абсолютного спирту. Проби добре перемішували. Дослідні пробірки центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Готували новий ряд центрифужних пробірок. Надосадову рідину і рідину з контрольної пробірки переносили у нові відповідні пробірки. Готували окислювач: 1 частину 7% хлораміну змішували з

4 частинами ацетат-цитратного буфера. У всі пробірки додавали 0,1 мл окислювача. Перемішували і додавали 0,1 мл ізопропілового спирту. Витримували 4 хвилини. У всі пробірки додавали 0,3 мл реактиву Ерліха (парадиметиламінобензальдегід (1 г), спирт етиловий (95 мл), гідрохлоридна кислота концентрована (20 мл)). Об'єм рідини в кожній пробірці доводили до 1 мл ізопропіловим спиртом. Добре розмішували. Поміщали на водяну баню і витримували 30 хвилин при температурі 60 ˚С. Охолоджували. Вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 540 нм в кюветі 10 мм проти контролю. Розрахунок проводили по калібрувальній кривій.

Визначення фукози. Фукозу визначали методом Шараева П. Н. та співавт. [189]. Принцип методу полягає в тому, що фукоза при нагріванні з сірчаною кислотою з додаванням цистеїну утворює продукт, концентрація якого прямо пропорційна концентрації фукози. Для з'ясування помилки поправки на фарбування, яке може викликатися різними сахарами, оптичну густину визначають при різній довжині хвиль 396 нм і 430 нм.

У 2 пробірки додавали по 0,1 мл гомогенату і 5 мл 95% етанолу. Центрифугували 15 хвилин (3000 обертів/хвилину), декантували, знову розчиняли осад в 5 мл етанолу. Центрифугували і знову повторно декантували. Осаджені білки розчиняли в 1 мл 0,1 N NaOH. У пробірки додавали по 4,5 мл охолодженого розчину сірчаної кислоти (сірчана кислота:вода = 6:1). Вміст пробірок перемішували. Після цього нагрівали на водяній бані 3 хвилини, охолоджували. Додавали 0,1 мл цистеїнового реактиву в одну з досліджуваних пробірок, в іншу додавали воду. Проби залишали на 1 годину при кімнатній температурі. Екстинкцію визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвиль 396 нм і 430 нм. В холосту пробу замість цистеїнового реактиву додавали 0,1 мл дистильованої води. Розрахунок проводили щодо стандартного розчину фукози і виражали в мкмоль/г.

Визначення гексуронових кислот. Принцип методу визначення гексуронових кислот полягає в тому, що гексуронові кислоти при нагріванні з

сильними кислотами (сірчаною) перетворюються на альдегід фурфуролу або його гомологи. Отримані альдегіди конденсуються з ароматичними фенолами (карбазол), що і визначається фотометрично. У центрифужну пробірку додавали 0,5 мл гомогенату і 2 мл охолодженого розчину 94% етанолу, який містить 0,1 М оцтовокислого калію і 0,17 М оцтової кислоти. Пробу перемішували, через 5-6 хвилин центрифугували 15 хвилин при 3000 обертів/хвилину. Осад емульгували в 3,0 мл 6% трихлороцтової кислоти. Пробу охолоджували, центрифугували 10 хвилин при 3000 обертів/хвилину. У надосаді визначали вміст гексуронових кислот. Для цього на кожну пробу брали по дві пробірки, додавали в кожну по 1 мл надосадової рідини і по 5 мл концентрованої сірчаної кислоти, яка містить 0,2 М кристалічного тетраборнокислого натрію. Нагрівали 10 хвилин на киплячій водяній бані, охолоджували. У першу пробірку додавали 0,1 мл 0,01 М розчину карбазол у 16,1 М етанолу, а в іншу – 0,1 мл розчину 16,1 М етанолу. Нагрівали 120-130 секунд на киплячій водяній бані. Через 10 хвилин колориметрували в кюветах шириною 10 мм при зеленому світлофільтрі проти розчину сірчаної кислоти з тетраборнокислим натрієм. Розрахунок проводили щодо стандартного розчину глюкуронової кислоти та виражали в мкмоль/г[190].

2.5. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів

Визначення вмісту шиффових основ та дієнових кон'югатів. У щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера поміщали аліквоту, що містила 0,1 мг білка досліджуваного зразка, додавали 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 та гомогенізували 10 хв. Проби центрифугували (1000 g, 15 хв) у пробірках з притертою пробкою. Надосадову фракцію відбирали та додавали 0,5 мл дистильованої води для розшарування фаз

гептану та ізопропілового спирту. Верхню гептанову фазу відбирали для визначення вмісту шиффових основ на флуориметрі RF-510, Shimadzu (Японія) за умов λ (збуд.)=360 нм і λ (еміс.)=420 нм. Вміст шиффових основ виражали в умовних одиницях на 1 мг білка.

Для визначення дієнових кон'югатів у хімічні пробірки відбирали по 0,3 мл гептанової фази, додавали 1,5 мл 96% етилового спирту, проби перемішували, вимірювали поглинання при λ=233 нм на спектрофотометрі. Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховували, виходячи з величини молярного коефіцієнту екстинкції при 233 нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот, що дорівнює 2,2 х 105 см-1х М-1 та виражали у нмолях на мг білка [191], [192].

Визначення вмісту ТБК-активних продуктів. В пробу вносили аліквоту досліджуваного зразка, який містив 0,5 мг білка у трис-буфері (25 мМ трис-HCl, 175 мМ KCl, pH=7,4) та додавали 0,2 мл 17% трихлороцтової кислоти (ТХО). Проби центрифугували при 1000 g 15 хв. До супернатанта (0,5 мл) додавали 0,25 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти (ТБК) та інкубували на киплячий водяній бані 10 хв для розвитку забарвлення. Визначення інтенсивності забарвлення проводили на спектрофотометрі при λ=532 нм. Вміст ТБК-активних продуктів виражали у нмолях на 1 мг білка та розраховували на основі значення молярного коефіцієнта екстинкції комплекса малонового деальдегіда з 2-тіобарбітуровою кислотою: ε = 1,56 х 105 см-1х М-1[193].

Визначення вмісту пероксиду водню. У пробірку вносили 200 мкл досліджуваного зразка то додавали 2 мл робочого реагенту, що являв собою суміш 1:100 двох розчинів: 25 мМ $(NH_4)_2Fe(SO_4)_26H_2O$ у 2,5М H_2SO_4 (розчин I) та 100 мМ сорбітолу зі 125 мкл ксиленового оранжевого (розчин II). Інкубували 15-20 хв за кімнатної температури та визначали оптичну густину проб за

допомогою спектрофотометра за довжини хвилі 560 нм. Вміст пероксиду водню розраховували за калібрувальною кривою, яку отримували за допомогою серії розведень стандартного розчину H_2O_2[194].

2.6. Визначення активності ферментів антиоксидантної системи у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів

Визначення ферментативної активності супероксиддисмутази. Активність СОД у клітинах визначали за Чеварі та співав. (1985). Метод базується на здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотида (НАД.Н) та феназинметасульфата (ФМС). В результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. У присутності СОД процент відновлення НСТ зменшується. У пробу, що містила 0,15 М фосфатний буфер, додавали аліквоту досліджуваного зразка (0,5 мг білка). Загальний об'єм проби становив 0,5 мл. До проби додавали 1 мл реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (pH=7,8). Одразу вимірювали поглинання проб при λ=540 нм на спектрофотометрі. Потім до кожної проби додавали 0,035 мл реагенту 2 (98,5 мкМ НАД.Н на Трис-ЕДТА буфері, pH=8,0), проби витримували при 30^{o}C та повторно визначали екстинкцію через 10 хвилин за тих же умов. За формулою розраховували відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі:Е2 – Е1/Е2 х 100 % = відсоток блокування реакції відновлення НСТ,де

Е1 – екстинкція до додавання реагенту 2,

Е2 – естинкція після додавання реагенту 2.

Активність ферменту визначали за калібрувальною кривою та виражали в умовних одиницях на хвилину на 1 мг білка[195].

Визначення ферментативної активності каталази. Активність КАТ в клітинах визначали за Королюк та співав. (1988). Принцип методу полягає в тому, що КАТ руйнує субстрат H_2O_2, незруйнована частина пероксиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс.

У пробірки вносили 2 мл 0,03% розчину пероксиду водню. Реакцію починали додаванням 0,1 мл клітинного лізату (0,1 мг білка). У холосту пробу замість білка додавали 0,1 мл дистильованої води. Проби витримували при кімнатній температурі 10 хв, реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при λ=410 нм проти контрольної проби, у яку замість пероксиду водню додавали 2 мл H_2O.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$E=(A_{хол}- A_{дос}) * V * t * K,$$

де E – активність каталази, $A_{хол}$ і $A_{хол}$ - екстинція холостої та дослідної проб, V – об'єм проби, t – час інкубації 600 с, K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню, що дорівнює 22,2 х 10^3 $мМ^{-1}$ х $см^{-1}$. Активність визначали у нмоль H_2O_2 на хвилину на 1 мг білка[196].

2.7. Підготовка та фарбування мазків крові щурів

Мазки крові готувалися на знежиреному предметному склі за допомогою покривного скельця. Перед забором крові предметне скльце промивали дистильованою водою та знежирювали розчином Нікіфорова (1:1 метиловий спирт : діетиловий ефір). Предметне скло висушували на фільтрувальному папері. Першу краплину крові, яка виступила після обрізання кінчика хвоста

щура, витирали стерильним шматочком вати або бинта. Потім великим та середнім пальцями лівої руки брали предметне скельце за ребра і одним кінцем скла торкалися до верхівки краплі крові, що виступила. Правою рукою брали покривне скельце, ставили його краєм біля краплі крові та нахиляли до контакту із нею, щоб краплина крові розтіклася в кутку, утвореному двома скельцями. Тримаючи покривне скло під кутом сорок п'ять градусів, проводили ним по склу, розподіляючи кров тонким шаром. Мазок висушували на повітрі не підігріваючи.

Перед нанесенням забарвлення попередньої фіксаціції не використовували. На висушені мазки наносили 3 мл барвник-фіксатора Май-Грюнвальда на 3 хвилини. Не зливаючи фарбу додавали до неї 3 мл дистильованої води. Через 1 хв мазки занурювали у розведену суміш Романовського-Гімзи яка представляє собою суміш метиленового синього та еозину.

Фарбу Романовського застосовували із розрахунку 2 – 3 краплини фарби на один мілілітр дистильованої води. Через 20 – 25 хвилин мазок промивали дистильованою водою і висушували[187], [197].2.8. Визначення лейкоцитарної формули крові щурів

За допомогою об’єктива 10х (мале збільшення) знаходили край мазка крові. Наносили краплю імерсійного масла й не міняючи положення предметного скла, переходили на імерсійний об’єктив (90х) таким чином, щоб він був занурений в краплину масла. За допомогою мікрогвинта обирали відповідну фокусну відстань, досягаючи чіткого зображення клітин мазка крові. Диференціюючи лейкоцити, відмічали клітини за допомогою 11 – клавішного лічильника; підраховуючи не менше ніж 100 лейкоцитів. Підрахунок вели наступним чином: відступаючи 2-3 поля зору від краю мазка, далі 3-5 полів зору у здовж краю мазка, 3-5 полів зору під прямим кутом від центру мазка та 3-5 полів зору паралельно краю и т.д.; таким чином скло рухалось ломаною лінією (лінія «меандра»). Обрахувавши половину клітин з одного краю мазка, міняли положення скла й другу половину клітин підраховували з іншого краю.

При диференціюванні лейкоцитів, клітини що були пошкоджені до обрахунку не бралися. Якщо при підрахунку 100 лейкоцитів спостерігалося відхилення від норми – перерахунок повторювали. В Табл. 2.1 представлені основні морфологічні особливості лейкоцитів[187], [197], [198].

Таблиця 2.1

Загальні морфологічні особливості формених елементів крові

Тип	Нейтрофіли		Еозинофіли	Базофіли	Лімфоцити	Моноцити
	П	С				
Розмір клітини, мкм	10-15	10-15	12-15	8-12	8-10	15-20
Форма ядра	Вузьке, витягнуте у вигляді палички	Вузьке, склад. 3-5 сегментів	Ширше за нейтрофіл, склад. з 2-3 сегм.	Невизначене	Кулясте чи бобовидне	Поліморфне
Забарвлення	Темно-фіолетова	Темно-фіолетова	Фіолетова	Фіолетова	Темно-фіолетова	Світло-фіолетова
Цитоплазма	Рожева	Рожева	Блідо-рожева	Блідо-рожева з розмитими ділянками	У вигляді вузької блідо блакитної зони	Блідно-голуба чи сірувата
Зернистість її забарвлення, характер	Значна, дрібна, блідо-фіолетова	Значна, дрібна, блідо-фіолетова	Значна, займає всю цитоплазму, велика, рожева	Незначна дрібна, нерівномірна, фіолетова	Майже відсутня	Майже відсутня

2.9. Підрахунок лейкоцитів

Для підрахунку лейкоцитів набирали кров у малий змішувач до мітки 1,0 і розчин 5%-ної оцтової кислоти, підфарбований метиленовою синькою, до мітки 11. Ретельно перемішували, випускали 1-2 краплини і далі заповнювали камеру Горяєва. Підрахунок лейкоцитів проводили у 25 великих квадратах[187].

2.10. Визначення вмісту кортизолу у сироватці крові щурів

Для визначення вмісту кортизолу у сироватці крові щурів використовували метод імуноферментного аналізу за допомогою комерційного набору виробництва ТОВ НВЛ «Гранум» (м. Харків). У даній тест-системі використовується принцип конкурентного імуноферментного аналізу.

У лунки мікропланшета, на поверхні якого адсорбовані специфічні анти-Кортизол-антитіла, вносили по 25 мкл досліджуваного зразка та 100 мкл розчину кон'югату Кортизол-пероксидаза. Зразки інкубували протягом 60 хвилин при температурі 37°С. У цей період кортизол досліджвуного зразка конкурує з конь'югованим антигеном за зв'язок з антитілами на поверхні лунки. Після чтого пьять разів проводили відмивання стрипів відмиваючим розчином. Активність ферменту, зв'язаного на поверхні лунки мікро планшету, проявляли і вимірювали додаванням у лунки 100 мкл хромоген-субстрантної суміші та інкубацією протягом 20 хвилин при температурі 20-25°С у темному приміщенні. Після цього у лунки вносили 100 мкл стоп-розчу та вимірювали оптичну щільність у лунках на імуноферментному аналізаторі при довжині хвилі 450 нм. Визначення концентрації кортизолу проводили лінійно-логарифмічним методом за допомогою калібрувальної кривої.

2.11. Визначення вмісту адренокортикотропного гормону у сироватці крові щурів

Визначення вмісту АКТГ проводили методом імуноферментного аналізу за допомогою комерційних наборів виробництва DRG International Inc. (USA).У лунки мікропланшета, на поверхні якого адсорбований Стриптивідин, вносили по 200 мкл досліджуваного зразка та 25 мкл Реагента 1 (Коньюгат Біотин - антитіло). У кожну лунку вносили по 25 мкл Реагента 2 (Фермент мічених антитіл). Наступним етапом з лунок відбиралася уся рідка фаза, після чого 5 разів, використовуючи самплер, промивали кожну лунку мікропланшета Реагентом А (Сіль з сурфактантом) по 35 мкл на одну лунку. Для видалення рідкої фази мікропланшет перевертали на адсорбуючий папір. Після цього у кожну лунку мікроплашета додавали по 150 мкл Реагенту Б (Субстрат тетраметилбензидину), встановивши мікропланшет на орбітальний змішувач при 170 об/хв. за кімнатної температури у непроникному для світла приміщенні. Через 30 хв. в кожну лунку вносили по 100 мкл Реагента С (стоп-розчину), обережно змішуючи. За допомогою мікропланшетного рідера (BioTek Sinergy 2) обраховували поглинаючу здатність розчина протягом 10 хв. при довжині хвилі 450 нм проти 250 мкл дистиляту. Додатковий аналіз проб проводили при довжині хв. 405 нм проти 250 мкл дистиляту. Використовуючи отримані дані, будували калібрувальну криву третього порядку для визначення концентрації АКТГ.

2.12. Метод визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран

Визначення впливу меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран виконувалося за аналізом нестаціонарних циклічних вольт-амперних

характеристик (ЦВАХ) бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ). Мембрани формували за стандартною методикою Мюллера з використанням азолектину (23 мг/мл) в n-декані («Біофарм», Україна) в оточенні водного розчину електроліту (100 мМ KCl, х.д.ч.)[199]. Електричні параметри БЛМ (електрична провідність G, нСм/см^2, електрична ємність С, мкФ/см^2) визначали за зміною потенціалу на мембрані (±100 мВ, частота разгортки 0,01 Гц). Реєстрація ЦВАХ БЛМ проводилась через 10 хвилин після внесення меланіну у навколо мембранний розчин.

2.13. Аналіз вмісту цитокінів в сироватці крові щурів

Визначали в сироватці крові щурів вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-12В р40, ІНФ-γ, ФНП-α) та антизапальних цитокінів (ІЛ-4 та ІЛ-10) методом імуноферментного аналізу. Імуноферментний аналіз проводили у мікропланшетах із сорбційною здатністю за стандартною методикою для розчинних білків[200]. Матеріалом дослідження були солюбілізовані фракції сироватки щурів, білковий матеріал якої використовували як специфічні антигени (досліджувані цитокіни) до відповідних антитіл. Для визначення ІЛ-4 та ІЛ-10 використовували мишині моноклональні антитіла (Sigma), для ІЛ-12В р40 – кролячі поліклональні антитіла (Sigma), для ІЛ-1β та ІНФ-γ – козячі поліклональні антитіла (Sigma). Антигени розводили 50 мМ Трис-HCl буфером (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl, до концентрації 10 мкг/мл та інкубували у комірках планшетів протягом 60 хв при 37^{o}С та постійному перемішуванні. Для видалення антигена, що не зв’язався, комірки відмивали Трис-HCl буфером (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Надалі інкубацію проводили у 50 мМ Трис-HCl буфері (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl (робочий буфер). Для блокування неспецифічних місць зв’язування використовували 3% розчин знежиреного молока або 2% розчин БСА. Комірки відмивали робочим буфером з вмістом

0,05% Твіну-20 та інкубували з розчином первинних антитіл протягом 60 хвилин при 37°С. Надалі проводили відмивку робочим буфером з вмістом 0,05% Твіну-20 та інкубували з вторинними антитілами (антимишиними, антикролячими або антикозячими), кон'югованими з лужною фосфатазою протягом 60 хвилин при 37°С. По закінченню інкубації комірки знову відмивали робочим буфером з вмістом 0,05% Твіну-20 та інкубували з субстратом для лужної фосфатази (1 мг/мл pNPP у 10% диетаноламіні, pH 9,8) при 37°С протягом 60 хв. Вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 405 нм (робоча хвиля) та 492 нм (похибка вимірювання) на мікропланшеточному спектрофотометрі "Synergy" (BioTek, США). Вміст антигену, специфічного до відповідних первинних антитіл, у досліджуваних зразках розраховували як різницю екстинцій при 405 нм та 492 нм і виражали в умовних одиницях (ум.од.).

2.14. Статистична обробка даних

Одержані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки наші дані виявилися нормально розподілені, порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), похибка середнього значення (m). Для наших даних ми приймали рівень значущості $p<0,05$[201].

РОЗДІЛ 3

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

Протягом понад століття ВХ залишається однією з провідних проблем абдомінальної хірургії, з високим рівнем захворюваності і смертності. Вона турбує до 10% людей у світі [202]. Патофізіологія ВХ припускає дисбаланс між агресивними (гідрохлоридна кислота, пепсин і Helicobacter pylori) і захисними факторами (муцин, простагландини, бікарбонати, оксид азоту і фактори росту)[203].Існують два основних підходи до лікування цього захворювання. Перший пов'язаний із зменшенням шлункової секреції гідрохлоридної кислоти, другий – із забезпеченням захисту СОШ[203], [204]. Ряд препаратів, включаючи інгібітори протонної помпи, аналоги простагландинів, антагоністи гістамінових рецепторів та цитопротективні агенти, на сьогодні є основними засобами для лікування ВХ. Клінічна оцінка тривалої терапії зазначеними препаратами свідчить про розвиток толерантності та значну частоту виникнення рецидивів і побічних ефектів, що робить їх ефективність суперечливою[205]. Останні дані свідчать про те, що терапія за участю препаратів протонної помпи, особливо при їх тривалому прийомі і/або високих дозах введення, пов'язана з декількома потенційними побічними діями на ШКТ, як то: ризик виникнення клостридіального коліту та інших кишкових інфекцій, надлишковий бактеріальний ріст у тонкому кишечнику, спонтанний бактеріальний перитоніт. А також інші побічні ефекти, не пов'язані з ШКТ, такі як пневмонія, перелом шийки стегна, дефіцит вітаміну B_{12}, а також харчова алергія[206]. В наш час все більшу увагу привертає поширення *H. pylori* -

НПЗП-негативне виразкоутворення (ідіопатична виразкова хвороба ІВХ) [207]. Доведено, що *H. pylori*-негативні пацієнти характеризуються підвищеним рівнем секреції кислоти [208], вищім показником рецидивів ВХ та виразкових кровотеч у порівнянні з *H. pylori*-позитивними пацієнтами [209]. Дані фактори спеціалісти співставляють з стрес-індукоованним ураженнями СОШ, які характеризуються частим виникненням кровотеч та рецидивів захворювання [210]. Таким чином, тривале лікування потребує пошуку альтернативних підходів терапії.

В останні роки було проведено багато робіт з використанням природних лікарських речовин з метою з'ясування їх потенційної ефективності у профілактиці ВХ або їх впливу на перебіг хвороби. За результатами досліджень показано, що препарати та екстракти на основі флавоноїдів, мають спазмолітину [211], антисекреторну, антидіарейну[212], противиразкову та антиоксидантну дію на органи ШКТ[213]–[215]. Нашу увагу привернулипохідні поліфенольних сполук - меланіни, що віддзеркалюють властивості фенолвмісних сполук, проте є потужнішими за рахунок умов синтезу та умов існування їх продуцентів. Так, було показано, що меланін, виділений з дріжджеподібних грибів *Nadsoniella nigra* штам X1, зменшує рівень кортизолу у щурів, підданих дії соціального хронічного стресу[216].Ducrest та співавт. (2008) показали, що хребетні тварини, які мають темніше забарвлення шкіри, а отже, з більш інтенсивним синтезом меланіну, є стійкішими до дії стресу[217].

Основними факторами стрес-ідукованого ураження слизової визнано зниження кровотоку слизових оболонок (ішемія) і як наслідок реперфузійне пошкодження тканин [68]. У нормальних умовах стабільність СОШ підтримується завдяки мікроциркуляторному руслу і структурній цілісності слизового шару, які елімінують іони водню, кисневі радикали та інші потенційно токсичні речовини в просвіті шлунку та кишечника [43]. Слизовий шар захищає поверхню епітелію СОШ зв'зуючи іони бікарбонатів для нейтралізації іонів водню та підтримки нейтральних значень pH. Пошкодження СОШ розвиваються коли слизовий бар'єр не може блокувати шкідливий вплив

іонів водню і АФК [210]. Останнім часом спостерігається ріст практичного інтересу до потужних антиоксидантних властивостей рідкоземельниз металів, а саме оксидів церію [149]. Показано, що НДЦ демонструє антиоксидантну СОД-КАТ-подібну активність, а також володіє здатністю зв'язувати активні форми кисню (АФК) і реактивні форми азоту (РФА) [150]. Особливість структури нанокристалічного діоксиду церію дозволяє регенерувати після участі в окисних реакціях, що вигідно відрізняє його від відомих антиоксидантів, що втрачають свої властивості після першої взаємодії з АФК [156].

Дослідникамивідмічаєтьсясхожість між структурним і оптичним властивостями еумеланінів і наноматеріалами [127], а також антиоксидантну, фотопротекторну, протипухлинну та ферментативну дію за умов різних патологій. Проте в літератрі відсутні дані про порівняння впливу даних сполук в якості комплексних засобів проти дії стресу на організм.

3.1 Дослідження стреспротективної дії досліджуваних речовин

3.1.1. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на розвиток уражень в слизовій оболонці шлунку за умов нервово – м'язового напруження.

Стабільність та відновлення слизового бар'єру забезпечується підтримкою нервово-трофічного постачання його структур. Цей процес характеризується надходженням поживних речовин, кисню та утилізацією таких продуктів обміну, як вуглекислий газ, вільнорадикальні сполуки тощо. Емоційно-фізичне навантаження провокує дезінтеграцію вегетативної нервової системи, що є причиною підвищення секреції шлункового соку та тривалого спазму судин шлунку. Локальне сповільнення кровопостачання зумовлює ішемію відповідних ділянок шлунку. За умов ішемії спостерігається накопичення пуринів, лактату, двоокису вуглецю та інших метаболітів на фоні зниження концентрації кисню в тканині[61]. Відновлення циркуляції крові за допомогою компенсаторних механізмів, як наприклад активація ендотеліальної синтази оксиду азоту, призводить до реперфузійної гіперемії. Клітини усіх шарів стінки

шлунку, у тому числі слизового бар'єру, за умов гіперемії, після кисневого голодування, активно споживають кисень, генеруючи перекисні сполуки, що призводить до ураження клітинних мембран та вільнорадикального ульцерогенезу[61].

Встановлено, що через 2 години після закінчення дії стресу в СОШ щурів контрольної групи розвивались виразки та ерозії, площа та довжина яких відповідно складали 9,5±2,4 мм^2 та 14,5±2,4 мм з розрахунку на один шлунок. У групі щурів, яким за 20 хвилин до початку дії стресу вводили меланін, ураженість СОШ була значно меншою. В середньому площа виразок та довжина ерозій в одному шлунку складали 3,38±1,01 мм^2(рис. 3.1) та 9,6±2,61 мм(рис. 3.2).

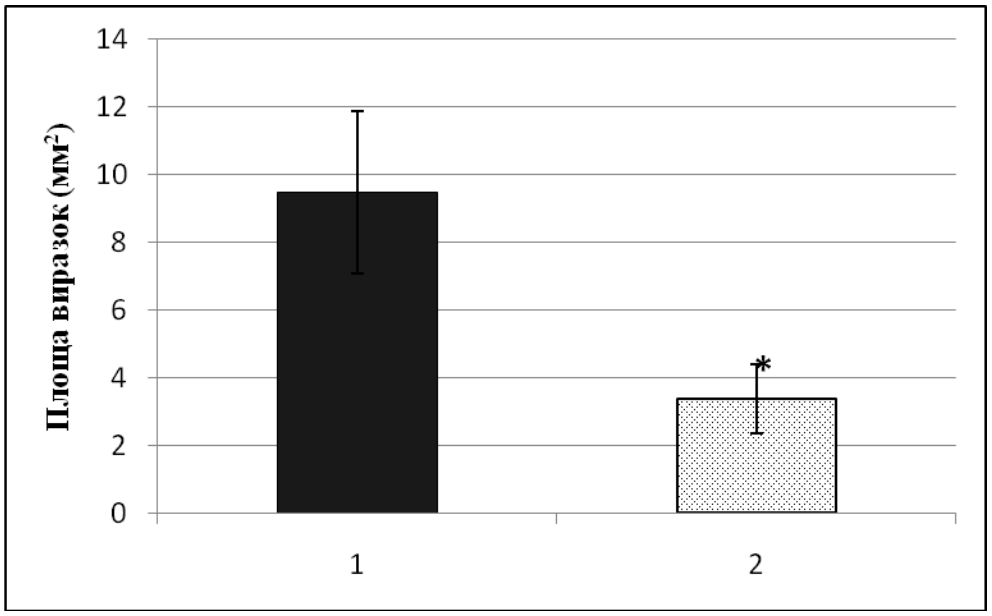

Рис. 3.1. Площа виразок у слизовій оболонці шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os(M±m):1- стрес(n=10), 2- стрес і меланін(n=10).
Примітка:* - p<0,05 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

Тобто, меланін на 64% (p<0,05) зменшував площу виразок, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє(рис. 3.1). Що стосується ерозій, то спостерігалася лише тенденція до їх зменшення (рис. 3.2). Таким чином, при профілактичному введенні меланіну спостерігався виражений

гастропротекторний вплив меланіну. Одним із механізмів описаних ефектів меланіну є його антиоксидантна дія, пов'язана з наявністю в будові поліфенольного комплексу[218].

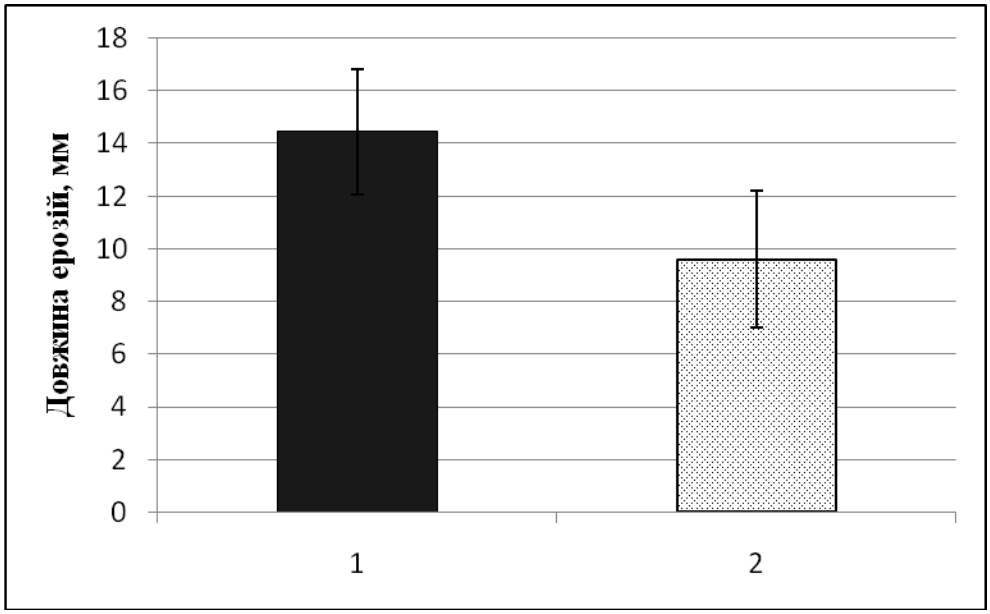

Рис. 3.2. Довжина ерозій у слизовій оболонці шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os(M±m):1- стрес(n=10), 2- стрес і меланін (n=10).

Відомо, що активні форми кисню (АФК) посилюють виділення прозапальних цитокінів. Так, показано, що АФК можуть підвищувати вміст фактора некрозу пухлин α (TNF-α) в альвеолярних макрофагах мишей в умовах отруєння кремнеземом, що ще більше посилює оксидативний стрес [219]. Зростання інтенсивності запальних процесів за умов виділення прозапальних цитокінів зумовлює активацію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи [220]. Надмірне виділення кортикостероїдів порушує процеси мікроциркуляції в СОШ, погіршує продукцію слизу, що в свою чергу зумовлює збільшення ураженості в шлунку[69], [221].За умов профілактичного введення меланіну зменшується утворення АФК, що відповідно пом'якшує протікання запального процесу. За даних умов уражуючий вплив стресу на СОШ зменшується. Отримані дані узгоджуються з результатами Чижанської та спів. 2005 де дослідники показали гастропротекторний вплив меланіну з чорних дріжджів

штаму *Nadsiniella nigra var. hesuelica*. Авторами було встановлено, що меланін на 100 % захищав слизову оболонку шлунку від уражень викликаних водно-імобілізайною моделлю стресогенезу. Даний вплив автори пов'язують з підвищенням концентрації оксиду азоту (NO) та ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) в крові за умов профілактичного введення меланіну [126]. Синтез NO запобігає вазоконстрикторному ефекту лейкотрієну C_4, тромбоксану А2, та ендотеліну, а також запобігає адгезії тромбоцитів і лейкоцитів до мікросудинного ендотелію, тим самим запобігаючи порушенню мікроциркуляції.

Середня площа виразок та довжина ерозій при досліженні гастропротекторної дії НДЦ дорівнювала 3 ± 0,55 мм^2 та 11,7±5,9 мм відповідно (рис 3.3.).

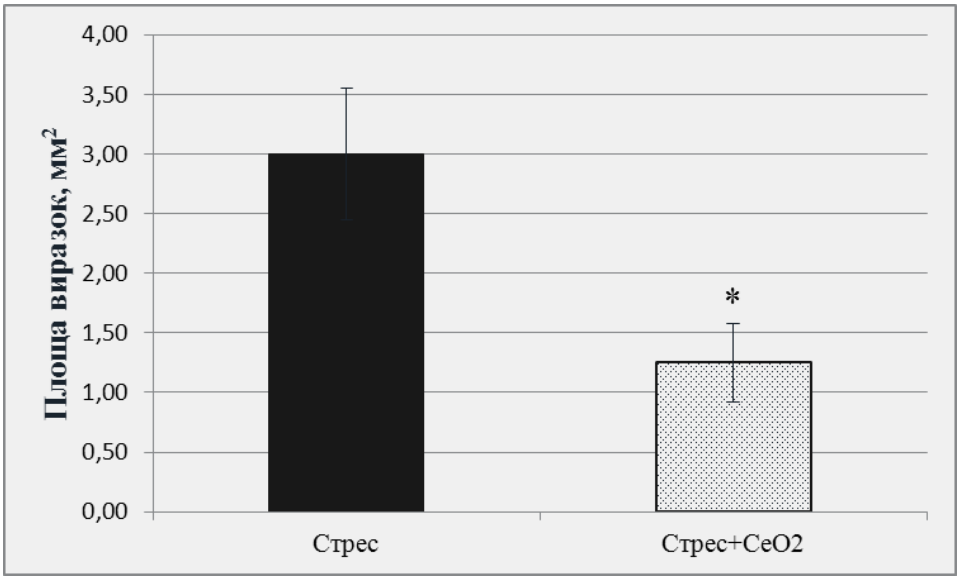

Рис. 3.3. Площа виразок у слизовій оболонці шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження та за умов профілактичного введення НДЦ в дозі 1мг/кг(M±m): Стрес(n=10), Стрес+CeO_2(n=10).
Примітка:* - p<0,05 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

Профілактичне введення CeO_2 значно скоротило площу виразок до 1,25 ± 0,33 мм^2, що нижче на 41,7% (p <0,05) порівняно з групою стрес-контролю (рис

3.3.). Що стосується ерозій, то спостерігалася лише тенденція до їх зменшення (рис 3.4.).

Гастропротекторна дія церію підтверджена, за умов моделювання оксидативного стресу викликаного етаноловою моделлю ульцерогенезу [222]. До етіологічних чинників ураження слизової шлунку відносять HCl, пепсин, жовчні кислоти, етанол, не стероїдні протизапальні препарати (НПЗП), *H. pylori*, а також реперфузійна гіперемія, як наслідок впливу стресу на організм [43]. Окисний стрес та генерація активних форм кисню (АФК), є спільною ознакою, що об'єднує механізми виразкоутворення усіх цих факторів [223].

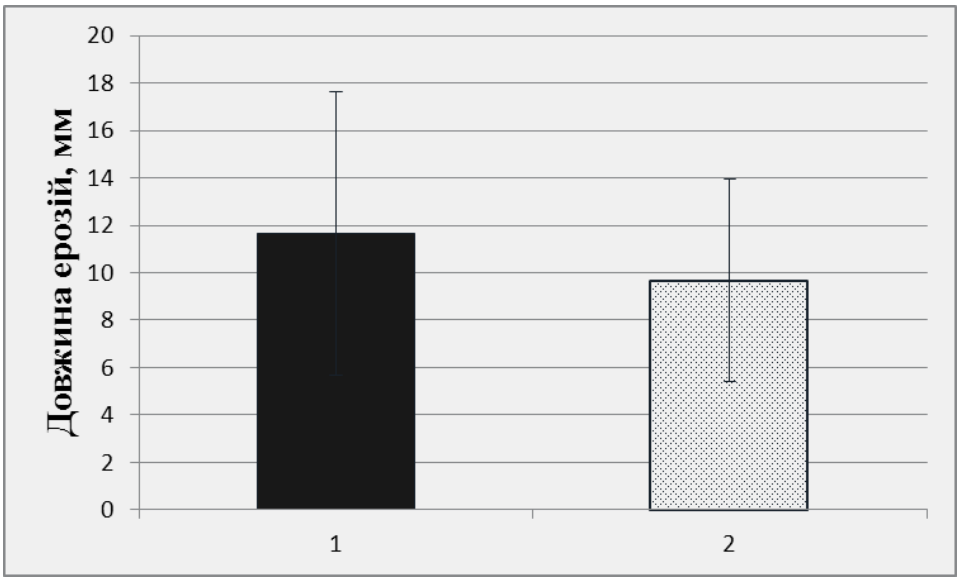

Рис. 3.4. Довжина ерозій у слизовій оболонці шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення НДЦ в дозі 1мг/кг per os(M±m):1- стрес (n=10), 2- стрес і меланін (n=10)

Отримані результати узгоджується, з дослідженнями де автори показали гастропротекторний вплив НДЦ за умов моделювання оксидативного стресу викликаного етаноловою моделлю ульцерогенезу [222]. До етіологічних чинників ураження слизової шлунку відносять HCl, пепсин, жовчні кислоти, етанол, не стероїдні протизапальні препарати (НПЗП), *H. pylori*, а також реперфузійна гіперемія, як наслідок впливу стресу на організм [68]. Окисний

стрес та генерація АФК, є спільною ознакою, що об’єднує механізми виразкоутворення усіх цих факторів[223].

Здатність наночастинок CeO_2 захищати слизову оболонку ШКТ від окисного стресу, пов’язують з наявністю Ce^{3+} та Ce^{4+} іонів на його поверхні, що є основою його КАТ-СОД-міметичної активності та здатності зв’язувати АФК, що виникають за умов окисного стресу [224], [225]. Ці припущення підтверджуються Colon et al. 2010 де автори показали радіопротекторний вплив наносполуки діоксиду церію на слизову оболонку ШКТ. Променево-індуковане ураження, відповідає подібному оксидативного стресу, що виникає за умов вище наведених ульцерогенних факторів, на клітинному рівні, що доводить зв'язок між цими роботами.

Основною функцією слизового бар’еру шлунку є захист від агресивно кислого середовища шлунку [68]. HCl, що синтезується парієтальними клітинами шлунку є ключовим фактором виразкоутворення СОШ за умов інфекційного- НПЗП- або стрес-індукованого ослаблення слизового барьеру [8]. Слизова бар’єр захищає поверхню епітелію від іонів водню і від інших шкідливі речовини, присутніх в кишечнику. Також слизовий бар’єр шлунку фіксує іони бікарбонатів, що синтезуються слизовою оболонкою, які нейтралізують H_2 підтримуючи нейтральний рівень pH СОШ. Ураження СОШ призводить до кислотного ураження шлунку[61]. Показано, що оксиди церію, в порівнянні з іншими рідкоземельними елементами, мають високу абсорбційну здатність молекул H_2 [226]. Потрапляючи в шлунок, CeO_2 звязується з клітиними мембранами та інтерналізується в клітину одним з трьох шляхів: піноцитозом, рецептор-регульованим ендоцитозом або фагоцитозом[226]. Таким чином можна припустити, що потрапляючи в парієтальну клітину, наночастинки CeO_2 здатні регулювати вивільнення іонів водню тим самим регулюючи синтез соляної кислоти та зниження її уразливої дії на ушкоджені ділянки СОШ. Це може стати перспективою досліджень використання церію в якості альтернативи препаратам ІПП.

Гострий стрес викликає протилежні ефекти верхнього та нижнього відділу шлунково-кишкового тракту. Стресогенні фактори, такі як зневоднення, радіаційний вплив, звукові пдразники, крововиливи, абдомінальні оперативні вручання, різка зміна температурного режиму, а також післяопераційні стани (мишей, щурів, морських свинок, собаки та мавп) характеризуються сповільненням перистальтики шлунку та затримка випорожнення шлункового вмісту[227].

Так само здорова людина реагує на гнів, страх, больові стимули, стан тривоги або інтенсивні фізичні навантаження, які впризводять до уповільнення випорожнення шлунку[227]. Тоді як в кишечнику спостерігається абсолютно протилежна дія. Кортикотропін-релізинг-гормон є центральним медіатором цієї реакції, що через специфічні КРГ-Р2 рецептори зменшує аферентну іннервацію шлунку через блукаючий нерв. Розлади моторики ШКТ можуть виступати первинним, провідним патогенетичним фактором таких станів, як функціональна диспепсія, гастроезофагеальна рефлюксна хвороба, дискінезія жовчовивідних шляхів, закрепи тощо, що можуть бути попередником виразквого ураження шлунку та стравоходу [184]. Профілактичне введення НДЦ протягом 10 днів per os стимулювало моторику шлунково-кишкового тракту, що відзначалося частоти та ампліту дискорочень ШКТ. Морфологічний аналіз змін слизової оболонки товстої кишки за умов дії НДЦ характеризувався відсутністю дифузної інфільтрації лімфоцитів, плазматичних клітин і збільшення кількість і розмір келихоподібних клітин, переповнених слизом, що відмічались у контрольній групі тварин [184]. Ці дані підтверджуються антинекротичним впливом наносполук на основі церію. Так вище наведені дані підтверджують гастропротекторний вплив меланіну та церію за умов моделювання дії стресу на організм щурів.

3.1.2. Визначення впливу меланіну та НДЦ на зміну маси органів стрес протекторної системи

З біохімічної точки стрес поділяють на три різновиди: емоційний, фізичний та змішаний. При емоційному стресі переважають зміни функцій симпато-адреналової системи та катехоламінергічних структур, а при фізичному – гіпоталамо-гіпофізарно-кортикоадреналової системи [228]. Відомо, що людина і тварини відповідають на дію стресових чинників переважно емоційними реакціями. Таким чином, проблема стресу все більше вважається проблемою емоційного стресу. Частіше емоційний стрес виникає при зміні реакцій поведінки та коли не вдається досягнути важливого результату в житті людини. В лабораторних умовах такі ситуації успішно моделюються шляхом іммобілізації тварин[31], [52].

Моделювання іммобілізаційного стресу супроводжувалося гіпертрофією наднирникових залоз (Рис. 3.5) та інволюцією тимусу (Рис. 3.6). Що є наслідком мобілізації захисних резервів організму у відповідь на стрес подразник на стадії тривоги за Сельє. Відомо, що апоптоз - це один з головних механізмів загибелі клітин тимусу. Він відіграє важливу роль у біології Т-клітин, шляхом вилучення потенційних аутореактивних клітин [229]. Наявність апоптотичних клітин у тимусі, від риб до ссавців, виявляється за допомогою моноклональних антитілмишачої анти-ДНК, кон'югованої з пероксидазою [230]. Ці антитіла пов'язують дволанцюгові фрагменти ДНК з низькою молекулярною вагою, що свідчить про внутрішньоядерну деградацію геномних ДНК, що спостерігається під час апоптозу[229]. Наступні досліди продемонстрували помітну ядерну позитивність до анти-ДНК в лімфоцитах людини та тимоцитах щурів, попередньо інкубованих дексаметазоном [231]. Інкубація тимоцитів з дексаметазоном, синтетичним аналогом стрес-гормонів оранізму клюкокортикоїдів, призводила до запуску апоптозу клітин шляхом

деполяризації та збільшення мембранної проникності мітохондрій, вивільнення активних форм кисню та запуску апоптичного каскаду клітини[232].

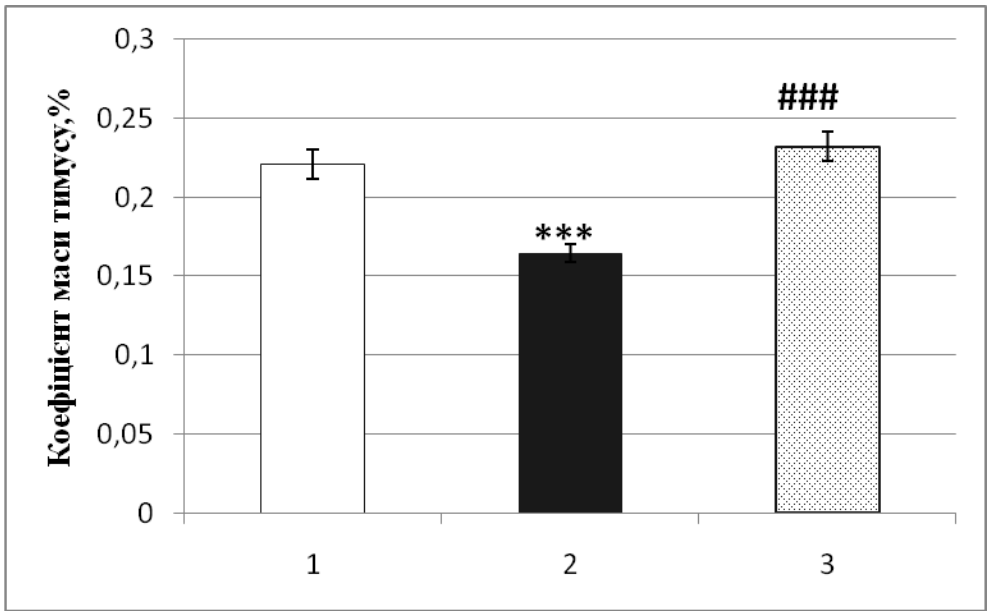

Рис. 3.5 Коефіцієнт маси тимусу після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os(M±m): 1-контроль(n=10), 2-стрес(n=10), 3-стрес і меланін (n=10).

Примітка: *** - p<0,001 у порівнянні з контролем, ### - p<0,001 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

У інтактних щурів коефіцієнт маси тимуса становив 0,220±0,0096 %. Моедлювання стресу призводило до інволюції тимусу. Так коефіцієнт маси вилочкової залози в групі стрес-контролю становив 0,164±0,0059 %, що на 26% p<0,001 менше від показників контролю. У щурів яким перед нанесенням стресу вводили меланін коефіцієнт маси тимусу не відрізнявся від контрольних значень і становив 0,232±0,0094 %.

Встановлено, що у щурів 1-ї групи коефіцієнт маси надниркових залоз становив 0,026±0,001. У щурів 2-ї групи цей показник зростав на 46% (0,038±0,001, P<0,001), що свідчить про гіпертрофію надниркових залоз, яка є

результатом підвищеного синтезу та секреції кортикостероїдів, в т.ч. кортизолу (рис. 3.6.).

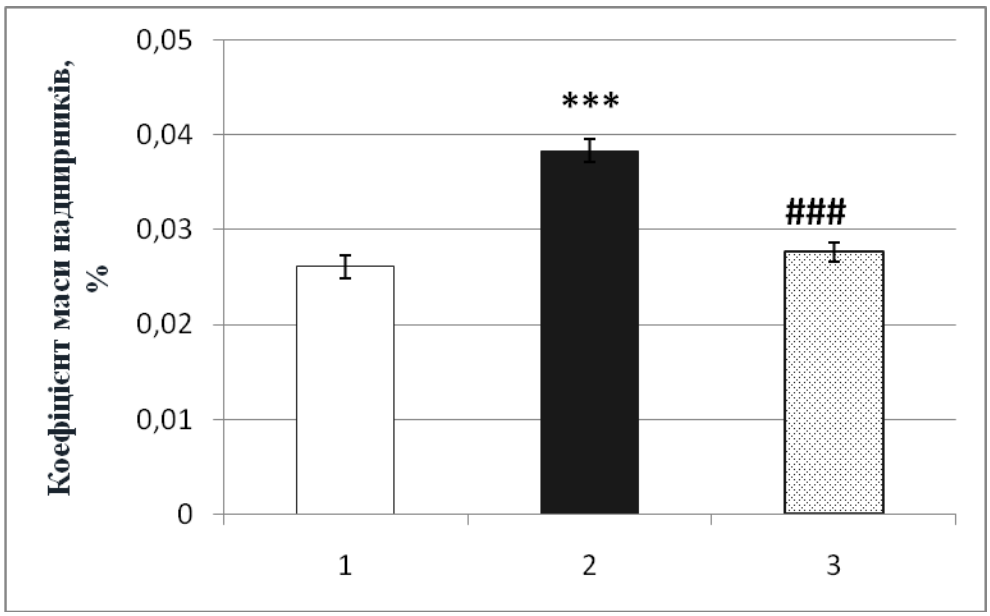

Рис. 3.6 Коефіцієнт маси надниркових залоз після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os(M±m): 1-контроль(n=10), 2-стрес(n=10), 3-стрес і меланін (n=10).
Примітка: *** p<0,001 у порівнянні з контролем, ### p<0,001 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Коефіцієнт маси надниркових залоз щурів, яким перед моделюванням стресу вводили меланін, статистично значущо не відрізнялися від контролю, що підтверджує виражену стреспротективну активність меланіну (рис. 3.5.).

При досліженні гастропротекторної дії НДЦ, вплив стресу у другій групі щурів було підтверджено збільшенням коефіцієнту маси наднирникових залоз (НЗ) та зниженням коефіцієнту маси тимуса щурів. Приріст коефіцієнту маси НЗ другої групи щурів склав 25% (p <0,05), тоді як інволюція вилочкової залози була на рівні 23% (p <0,05) в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 3.7).

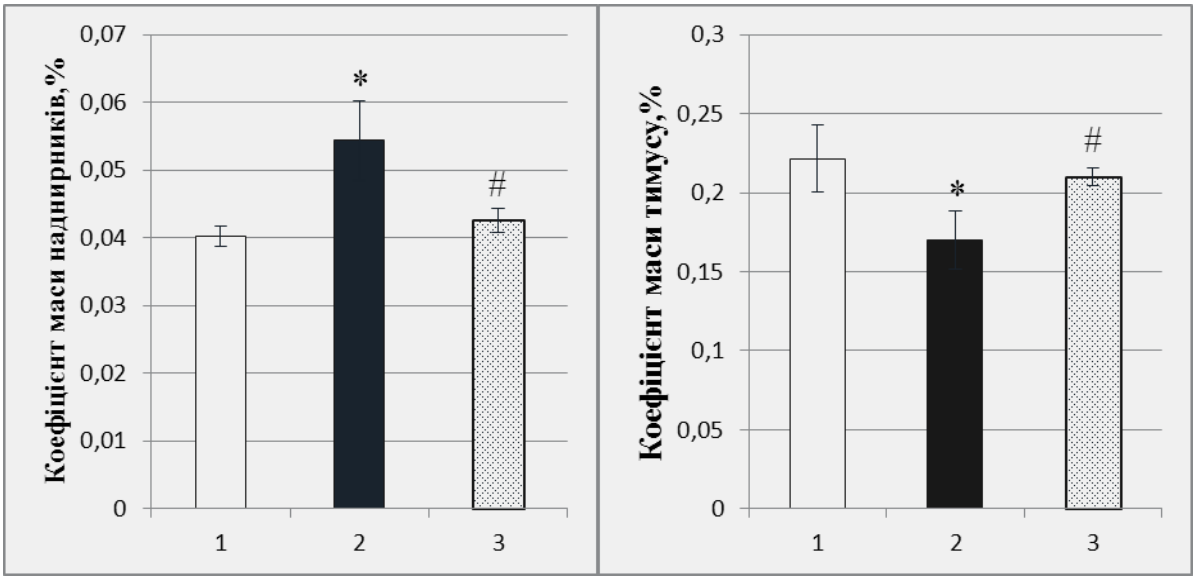

Рис. 3.7 Коефіцієнт маси надниркових залоз та тимусу після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг в.ш. (M±m): 1-контроль(n=10), 2-стрес+вода(n=10), 3-стрес і НДЦ (n=10).
Примітка:* p<0,05 у порівнянні з контролем, # p<0,05 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Терапевтичне введення НДЦ знижувало вагу НЗ на 22% (p<0,05) і призводило до збільшення ваги тимуса на 23,6% (p <0,05) порівняно з контрольною групою щурів.

3.1.3. Стан слизового бар'єру шлунку за умов нервово – м'язового напруження та профілактичного введення меланіну та НДЦ.

Під час запального процесу у зоні ураження СОШ підвищується синтез фактора росту фібробластів (FGF-2), інсуліноподібного фактора росту (IGF-1), а також трансформуючого фактора росту β (TGF-β). Вони активують трансформацію фібробластів сполучної тканини у міофібробласти, сприяють ангіогенезу та наступному реепітелізаційному процесу[233]. Під контролем цитокінсигнальної системи (TGF-β) фібробластами сполучної тканини шлунку синтезуються колаген та сполуки екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ - фібронектин, глікозаміноглікани, протеоглікани та гіалуронова кислота). Це

основні компоненти, необхідні для відновлення уражених ділянок СОШ за допомогою формування нового сполучнотканинного матриксу для стягування країв виразково-ерозивних уражень та забезпечення основи для міжклітинної адгезії, росту та диференціації клітин. Активація імунної відповіді й запального процесу збільшує системний вміст глюкокортикоїдів, що за умов їх надмірного впливу призводить до зниження синтезу цитокінів, мембранних ліпідів та простагландинів[233]. Це зумовлює зниження утворення колагену та сполук ЕЦМ, тоді як їх наявність в СОШ у вільній формі може вказувати на патологічні зміни слизової оболонки, що супроводжуються руйнуванням сполучної тканини. При цьому ускладнюється процес відновлення слизового бар'єру та рубцювання виразкових уражень. За таких умов відбувається руйнування СОШ, що виявляється у зростанні концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуронових кислот[234], [235].

Тому наступним етапом нашої роботи було дослідити вплив меланіну на стан слизово-епітеліального бар'єру. Показано, що у інтактних тварин вміст вільного оксипроліну в СОШ щурів становив 1,98±0,07 мкмоль/г. Після дії стресу в тканині СОШ вміст вільного оксипроліну зростав на 73,2% ($p<0,001$) порівняно з групою контролю, що свідчить про активацію колагенолітичних процесів (рис. 3.8).

При введенні меланіну вміст вільного оксипроліну в СОШ значущо знижувався на 29% ($p<0,001$) порівняно з 2-ю групою щурів. Hasebe та співавт. [235]показали важливість оксипроліну як одного з основних маркерів ульцерогенезу за умов водно-іммобілізаційного стресу. Тоді як інші автори [236] відмічають необхідність колагену у клітинній диференціації та швидкості гоєння виразкових уражень при етаноліндукованому ульцерогенезі.

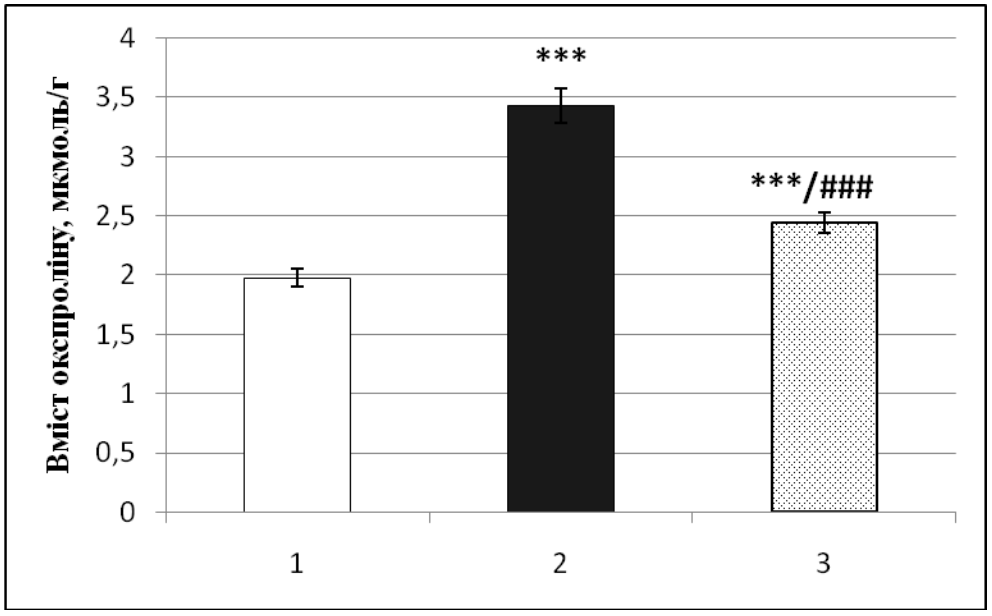

Рис. 3.8. Вміст вільного оксипроліну у пристінковому слизі шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os(M±m): 1- контроль (n=10), 2- стрес і вода (n=10); 2- стрес і меланін(n=10);

Примітка:* - p<0,001 у порівнянні з інтактним контролем, :# - p<0,001 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

Отже, меланін може виступати важливим елементом захисту структурної цілісності СОШ за умов дії стресу різного генезу.

Сполуки ЕЦМ також є місцем прикріплення шлункового патогена *Helicobacter pylori*. Зазначена взаємодія можлива через Lewis^{b}-антиген, фукозильований глікан, що містить α(1,2)-та α(1,4)-зв'язану фукозу. Фукоза - структурний моносахарид СОШ, що бере участь у лейкоцит-ендотеліальній адгезії, взаємодії хазяїн-мікроб та міжклітинній взаємодії через Notch-сигнальну систему [237]. Показано, що *H. pylori* проявляє властивості молекулярної мімікрії, тобто здатна до продукування Lewis^{b}-подібних структур хазяїна таких, як Lewis^{x}, Lewis^{s} та Lewis^{b}. Експресія вищезазначених фукозильованих гліканів *H. pylori* може індукувати ураження шлункового епітелію, що призводить до атрофічного гастриту у людей інфікованих ним[237].

Отже, ідентифікація підвищеного вмісту фукози у СОШ може слугувати маркером її ураження. Показано, гострий стрес призводив до збільшення вмісту вільної фукози в слизовому бар'єрі на 55% (p<0,001) порівняно з інтактними тваринами (рис. 3.9).

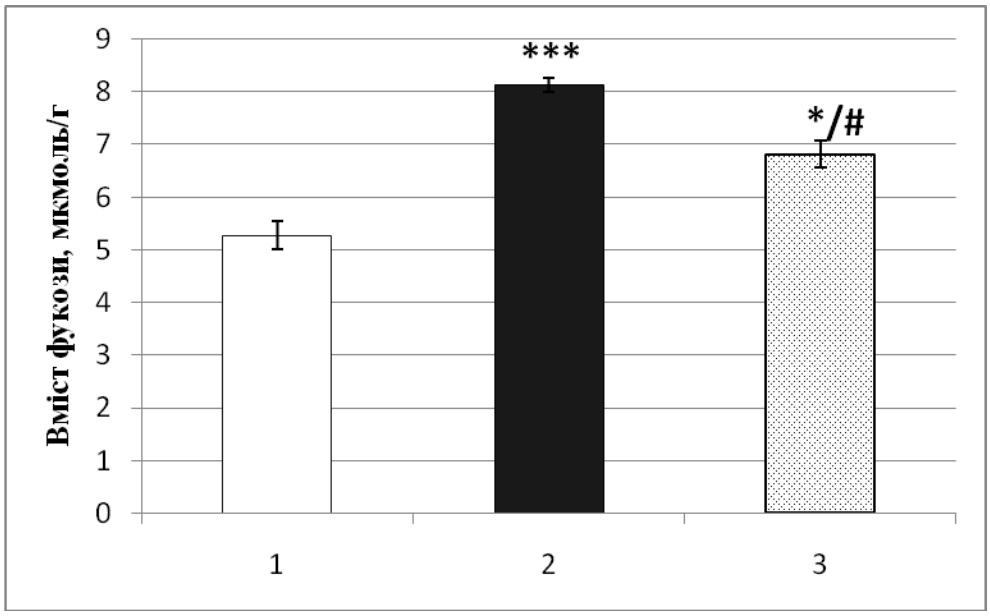

Рис. 3.9. Вміст вільної фукози у пристінковому слизі шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os (M±m):1- контроль(n=10), 2- стрес і вода(n=10); 2- стрес і меланін (n=10).

Примітка:*** - p<0,001 у порівнянні з інтактним контролем, :### - p<0,001 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

Після введення меланіну, відмічалося статистично значуще зменшення цього компонента в пристінковому слизі на 16% (p<0,001) порівняно з 2-ю групою щурів (рис. 3.9). Таким чином, меланін запобігає деградації фукопротеїнів сполучної тканини слизово-епітеліального бар'єру шлунку за умов дії стресу.

Також після нервово-м'язового напруження вміст вільних гексуронових кислот у пристінковому слизі шлунку збільшувався на 75% (p<0,001) порівняно з групою контролю (рис. 3.10).

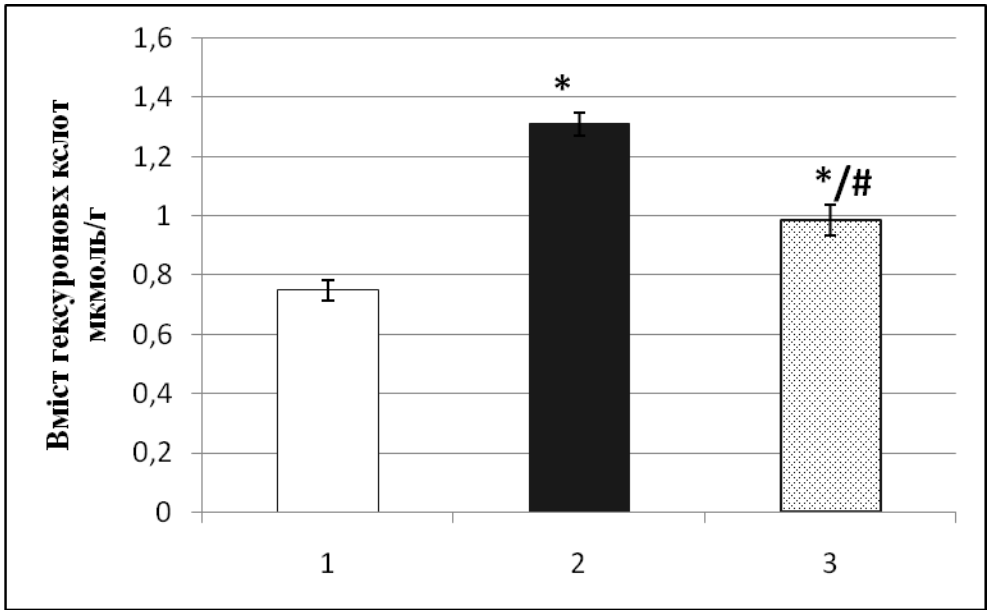

Рис. 3.10. Вміст вільних гексуронових кислот у пристінковому слизі шлунку щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг per os (M±m): 1-контроль(n=10), 2- стрес і вода (n=10); 2- стрес і меланін (n=10).

Примітка:* - $p<0,001$ у порівнянні з інтактним контролем, # - $p<0,001$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

При профілактичному введенні меланіну цей показник зменшувався на 24% ($p<0,001$) порівняно з щурами, яким вводили воду (рис. 3.10). Наші результати свідчать, що меланін ефективно захищає СОШ від деградації глікозаміногліканів.Отримані дані узгоджуються з дослідженням властивостей поліфенольних сполук. Так ангіогенез та колагенізація в тканинах шлунку є одними з основних молекулярних механізмів дії поліфенольного комплексу куркуми (*Curcuma longa)* куркуміну, яка опосередковується через регуляцію VEGF, підвищення експресії матричної металопротеїнази 1 та 2 (ММП 1-2) відповідальних за будівництво екстра целюлярного матриксу СОШ (колагенових волокон) мембранатипу (МТ) ММР-1, ММР-2 [21].

При дослідженні гастропротекторного впливу НДЦ нами було встановлено, що розвиток ерозивно-виразкових уражень в СОШ, викликаних нервово-м'язовим напруженням супроводжувався підвищенням деградації

колагенових волокон та слизово-епітеліального бар'єру захисних білків. Це супроводжувалось зростанням вільного гідроксипроліну, фукози і вільних глікозаміногліканів на 25.13% (p <0,05), 20% (p <0,001), і 69.35% (p <0,001) відповідно в порівнянні з інтактною групою (рис. 3.11.).

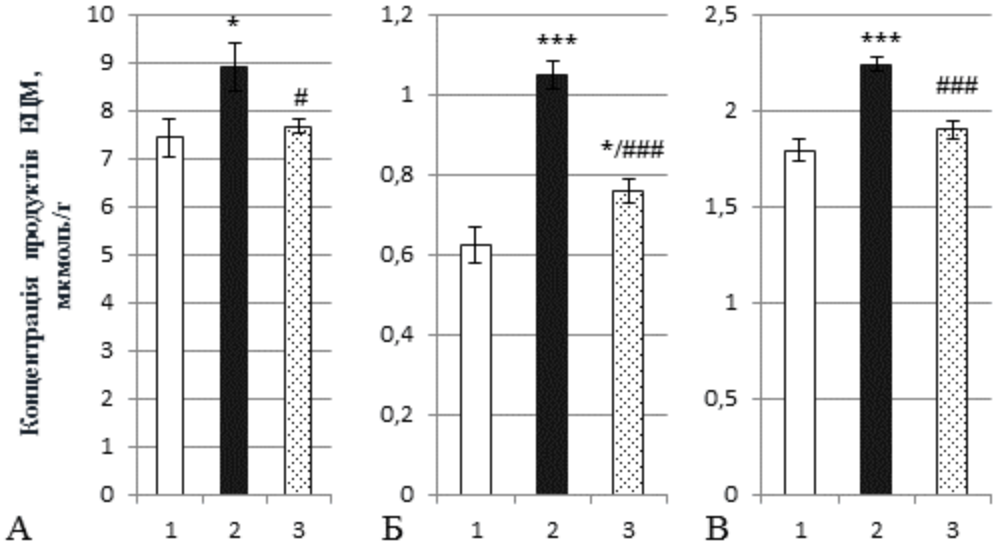

Рис. 3.11. Вміст фукози (А), гексуронових кислот (Б) і оксипроліну (В) в пристінковому слизі шлунку щурів після дії нервово-м’язового напруження, за умов профілактичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг (M±m):1- контроль(n=10), 2- стрес і вода(n=10); 3- стрес і НДЦ(n=10);

Примітка:* - p<0,05 у порівнянні з інтактним контролем , *** p<0,001 у порівнянні з контролем;# - p<0,05 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу, ### p<0,001 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

Терапевтичне введення НДЦ зменшило вміст вільного оксипролину в слизовому бар'єрі на 16% (p <0,001) порівняно з другою групою щурів, припускаючи часткове запобігання деградації білків колагену СОШ щурів, викликаних нервово-м'язовим напруженням. НДЦ запобігав деградації фукопротеїнам на 14% (p <0,05) проти стрес-контрольної групи. У СОШ тварин, яким було введено НДЦ (рис. 3.11.) рівень гексуронових кислот знизився на 28,66% (p <0,001). Таким чином, НДЦ запобігає деградації захисних білків слизу щурів, що була викликана дією стресу. Даний вплив

може бути пов'язаний з впливом НДЦ на прискорення загоєння уражених ділянок СОШ шляхом посилення міграції і проліферації фібробластів, кератиноцитів і клітинного ендотелію. Як було зазначено фібробласти виробляють більшість з вищенаведених компонентів ЕЦМ, що несе вирішальне значення у процесах загоєння уражень СОШ [238]. Chigurupati et al. 2012 було показано, що обробка культивованих кератиноцитів та фібробластів шкіри розчином НДЦ призводило до значного підвищення міграції кератиноцитів і фібробластів при обробці НДЦ у дозі 1 і 10 мкм. Обробка культури клітин протягом трьох днів значно підвищувало проліферацію та ріст клітин оброблених НДЦ у порівнянні з контролем, а також демонструвало підвищення в два рази швидкості міграції ендотеліальних клітин у порівнянні з контролем. Моделювання термічного ураження епідермісу мишей показало, що у контрольних щурів на тринадцятий день після ураження епітелію діаметр рани становив 1.2 мм тоді як група щурів у яких проводили обробку рани розчином НДЦ на 8 день характеризувалася відсутністю опікових уражень[239]. Ці дані підтверджують отримані нами дані про гастропротекторний вплив НДЦ на структурному рівні СОШ.

Отже,профілактичне введення меланіну та НДЦ попереджувало деполімеризацію колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу СОШ, свідченням чого є зменшення відповідно концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуронових кислот. При цьому цілісність слизового бар’єру була наближеною до значень контрольних щурів, що узгоджується з результатами макроскопічного аналізу СОШ.

3.2 Дослідження антиоксидантних властивостей досліджуваних речовин

3.2.1. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан прооксидантної системи щурів.

Нині є загальновизнаним, що розвиток окисного стресу є універсальним неспецифічним механізмом клітинного пошкодження при різних захворюваннях[134]. Активні форми кисню (АФК) мають ключову роль в патогенезі уражень шлунку. Через це переважним напрямком досліджень ВХ є пошук гастропротекторних препаратів здатних інгібувати метаболічні шляхи кисню[240]. АФК представляють собою атоми або молекули, які проявляють вищу хімічну активність, ніж молекулярний кисень у вихідному стані. Найпотужнішими АФК є вільні радикали, такі як супероксид радикал аніон ($O_2^{\cdot-}$), гідропероксил радикал($HO_2^{\cdot-}$) і гідроксильний радикал ($OH^{\cdot}$). Вони володіють високою реакційною здатністю за рахунок неспарених електронів на зовнішній поверхні. Перекис водню (H_2O_2), озон (O_3), синглетний кисень ($^1O_2$) не являються вільними радикалами, хоча також належать до класу АФК, через їх високу реакційну здатність до оксилення. Генерація АФК відбувається як внутрішньоклітинно (ВК) так і зовнішньоклітинно (ЗК) [240], [241]. ВК механізм генерації АФК переважно базується на локальних ішемічних епізодах в тканинах, що супроводжуються репер фузійною гіперемією тканин. В умовах ЗК моделі генерації АФК, вивільняється в позаклітинному просторі. Класичний приклад цього процесу є продукція супероксиду ($O_2^{\cdot-}$) нейтрофілами [229]. Kasazaki і ін. зафіксував зв'язок між джерелами позаклітинних і внутрішньоклітинних АФК[243]. Генерація $O_2^{\cdot-}$ ВК полегшує інфільтрацію тканин нейтрофілами, що призводить до збільшення пулу ЗК $O_2^{\cdot-}$[240].

Незалежно від типу АФК, на першій стадії АФК-опосередкованого ушкодження клітин є перекисне окислення компонентів клітинної мембрани, особливо мембранних ліпідів[244]. Цей процес включає АФК-опосередковане деструкційне окислення фосфоліпідів клітинної мембрани, таких як поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК). На першому етапі перекисного

окислення ліпідів, АФК від'єднує атом водню з ланцюга ПНЖК, що супроводжується перетворенняи АФК на воду, а жирної кислоти на вільний радикал. Зв’язуючись з молекулою кисню цей радикал генерує пероксильний радикал. Вільний пероксильний радикал, має здатність відокремлювати атоми водню від інших жирних кислот, створюючи перекиси ліпідів. У порівнянні з ліпідами, ліпідні пероксиди менш стабільні і можуть розпадатися на вільні радикали. Цей процес каталізують іони заліза і міді (Fe^{2+}, Cu^{2+}). Висока реакційна здатність перекисних радикалів з молекулами ліпідів, а також хімічна нестабільность ліпідних пероксидів, супроводжується позитивним зворотним зв'язком в перекисному окисленні ліпідів (ПОЛ), що залучає більшість ліпідв клітинної мембрани. Ліпопероксиди метаболізується, через β-окисний шлях до малонового діальдегіду (МДА) і 4-гідроксіноненал (4-ГНЕ) [240].

Продукти ПОЛ відповідають за ускладнення патофізіологічних процесів в клітині, тому вимірювання їх концентрації, можна вважати корисним інструментом в експериментальній та клінічні практиці, який відображає рівень пошкодження, викликаного окисним стресом [245]. Вони обумовлюють зміни властивостей клітиних мембран, шляхом вставки полярних груп в молекули фосфоліпідів, що знаходяться всередині подвійного ліпідного шару; таким чином, внутрішня частина ліпідної мембрани стає гідрофобною і більш проникною [246] . ПОЛ також викликає зміни мембранного потенціалу в бік деполяризації. Крім того, пероксидація пригнічує активність білків транспортерів, що призводить до розладу активного транспорту через мембрану. Альдегідні продукти перекисного окислення ліпідів, такі як МДА, вступають в реакцію з аміногрупами мембранних білків в результаті чого генеруються Шифові основи (ШО) і, отже, клітинної мембрани стає більш розрідженою. Крім того, реакція між МДА і білком клітинної мембрани змінює її антигенну характеристику [240], [247]. Продукти перекисного окислення ліпідів такі як МДА, (ШО), Дієнові конь’югати (ДК) та 4-ГНЕ, рекомендується використовувати в якості маркерів АФК-залежного ушкодження тканин в різних органах, включаючи шлунок і кишечник [240].

Встановлено, що в СОШ щурів контрольної групи вміст первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів складав 211,97±17,84 нМоль^{x}мг білка$^{-1}$. Через 2 години після дії стресу рівень дієнових кон'югатів зростав до 345,68±24,56 нМоль^{x}мг білка$^{-1}$, або на 63% ($p<0,05$). У щурів, яким перед нанесенням стресу вводили меланін, рівень первинних продуктів ПОЛ в СОШ не відрізнявся від контрольних значень і складав 209,88±12,37 нМоль^{x}мг білка$^{-1}$(табл.3.1).

Таблиця 3.1

Вміст продуктів перикисного окиснення ліпідів у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів за умов дії стресу та профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг (M±m)

Група тварин / Досліджуваний параметр	Контроль (n=10)	Стресс (n=10)	Стрес + Меланін (n=10)
Дієнові кон'югати, нМоль х мг білка$^{-1}$	211,97 ± 17,84	345,68 ± 24,56*	209,88 ± 12,37$^{\#\#\#}$
ТБК-активні сполуки, нМоль х мг білка$^{-1}$	102,71 ± 7,53	203,87 ± 13,62*	114,74 ± 7,71$^{\#\#\#}$
Шиффові основи, ум. од. х мг білка$^{-1}$	5,80 ± 0,36	10,56 ± 0,61*	5,99 ± 0,31$^{\#\#\#}$

Примітка: *- $p< 0,05$ у порівнянні з контролем; $^{\#\#\#}$ - $p< 0,001$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

При визначенні проміжних продуктів ПОЛ у СОШ щурів, які були піддані дії стресу, рівень ТБК-активних продуктів складав 203,87±13,62 нМоль^{x}мг

білка$^{-1}$ проти 102,71±7,53 нМоль^{x}мг білка$^{-1}$ у контролі. Таким чином, стрес збільшував утворення ТБК-активних продуктів на 98,5% ($p<0,05$). Введення щурам меланіну перед нанесенням стресу усувало зростання рівня ТБК-активних продуктів в СОШ. В СОШ даної групи щурів рівень ТБК-активних продуктів складав 114,74±7,71 нМоль^{x}мг білка$^{-1}$ (табл.3.1).

В контрольній групі тварин рівень Шиффових основ дорівнював 5,80±0,36 ум.од.^{x}мг білка$^{-1}$. Через дві години після дії стресу він досягав значення 10,56±0,61 ум.од.^{x}мг білка$^{-1}$, що перевищувало даний показник в контролі на 82% ($p<0,05$). У щурів, яким перед нанесенням стресу вводили меланін, рівень Шиффових основ не відрізнявся від контрольних значень і складав 5,99±0,31 ум.од.^{x}мг білка$^{-1}$ (табл.3.1).

За останніми данними НДЦ здатний проявляти, як антиоксидантний вплив [180], [248], [249] так і прооксидантний [250]. Це стало додатковим фактором у важливості проведення даних досліджень.

З огляду на вище сказане нами було встановлено, що після моделювання нервово-м'язового напруження інтенсивність перекисного окислення ліпідів у СОШ щурів значно збільшилась. Вміст дієнових кон’югатів, ТБК-активних сполук та шиффових основ збільшився відповідно на 55.58% ($p <0,05$), 83,12% ($p <0,05$) та 62% ($p <0,05$) порівняно з інтактною групою (рис 3.12.).

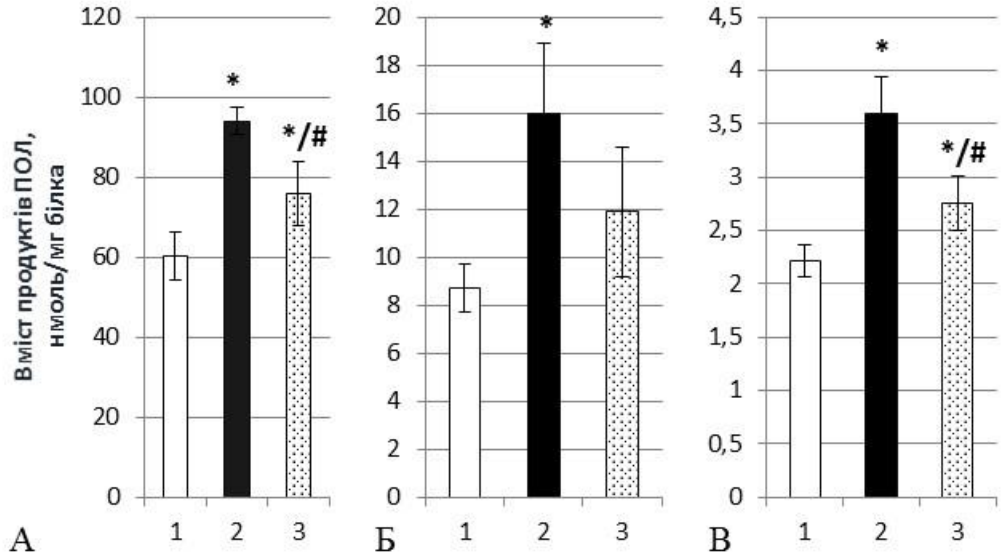

Рис. 3.12. Вміст дієнових коньюгатів (А), ТБК-активних продуктів (Б) та шиффових основ (В) у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів за умов дії стресу та профілактичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг (M±m) в.ш.:1-контроль(n=10), 2- стрес і вода(n=10); 3- стрес і НДЦ(n=10)

Примітка: * - $p<0,05$ у порівнянні з контролем; # - $p<0,05$ у порівнянні з контролем

Введення НДЦ зменшувало вміст дієнових коньюгатів 19.15% ($p<0.05$), ТБК-активних продуктів на 25% ($p<0.05$), та шиффових основ на 24.4% ($p<0.05$) в слизовій оболонці шлунку у порівнянні з групою стрес-контроль. Li et al. 2016 досліджували вплив CeO_2 на зміни функцій остеобластів та окисне пошкодження в MC3T3-E1 клітинах остеобластів після обробки культури клітин пероксидом водню[251]. Дослідження показало, що НДЦ значно підвищував проліферацію, а також попереджував апоптоз клітин MC3T3-E1 вікликаний обробкою H_2O_2. Рівень МДА у клітин оброблених H_2O_2 був значущо вищім у порівнянні з контролем. Профілактичне введення НДЦ демонструвало значущо нижчий показник МДА у порівнянні з групою без профілактики [251]. Kobyliak et al 2016 вперше досліджували вплив НДЦ на перекисне окислення ліпідів печінки у щурів з моделлю експериментального неалкогольного ожиріння печінки. Профілактичне введення НДЦ значно знижувало перекисне окислення ліпідів в тканини печінки викликане ожирінням, за зниженням

вмісту малонового деальдегіду, Шифофих основ та Дієнових конь'югатів. Даний вплив може бути пов'язаний, як з СОД-міметичними властивостями НДЦ так і можливістю проходити через мітохондріальну оболку завдяки цитрату, що являється стабілізатором НДЦ та допомагає реалізувати антиоксидантні властивості в дихальному ланцюзі мітохондрій, які виступають джерелом АФК при патологічних станах[252]. Вищенаведені дані підтверджують антиоксидантний вплив меланіну та НДЦ.

3.2.2 Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан антиоксидантної системи щурів

Важливими ферментами антиоксидантної системи є СОД, яка перетворює супероксидний радикал у перекис водню, та КАТ, яка інактивує утворений з СОД пероксид водню. Завдяки такій спільній роботі цих ферментів вміст активних форм кисню тримається в межах фізіологічної норми. Супероксид аніон ($O_2^{\cdot-}$) перетворюються в пероксид водню (H_2O_2) в ході спонтанної або каталізуючої реакції дисмутації. СОД є фермент, який каталізує дисмутації $O_2^{\cdot-}$ в менш шкідливий H_2O_2[253]. СОД можна розділити на три види: цитоплазматична, мітохондріальні та позаклітинні. H_2O_2 формується за рахунок активності СОД та в подальшому руйнується завдяки активності каталази та глутатіонпероксидази [240], [254]. Фермент каталаза прискорює трансформацію H_2O_2 на воду і кисень. Другий біохімічний шлях H_2O_2 метаболізму залежить від активності глутатіонпероксидази, яка взаємодіє з глутатіонредуктазою розкладає H_2O_2 на воду та відновлений глутатіон [240]. Як було, зазначено стрес може викликати активацію прозапальних процесів в організмі. За умов тривалого стресу рівень ферментів антиоксидантно захисту знижується, що може призвести до ускладнення віднового процесу [255].

Встановлено, що за умов дії іммобілізаційного стресу, у гомогенаті СОШ щурів активність СОД зростала на 29% ($p<0.05$), а КАТ на37%($p<0,05$) відносно контролю (табл.3.2.) Профілактичне введення меланіну стресованим щурам

сприяло збільшенню активності СОД, при цьому рівень КАТ був в межах контрольних значень (табл.3.2).

Отже, меланін виступає стабілізатором рівня атиоксидантного захисту організму, активуючи фермент антиоксидантного захисту (СОД), а також виявляючи власні стреспротекторні властивості, запобігаючи уразливій діяльності активних форм кисню, на що відновлений рівень продуктів ПОЛ.

Таблиця 3.2

Стан антиоксидантної системи у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів за умов дії стресу та профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг (M±m)

Група тварин / Досліджуваний показник	Контроль (n=10)	Стрес (n=10)	Стрес + Меланін (n=10)
Супероксиддисмутаза, ум. од. х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	0,41 ± 0,03	0,53 ± 0,04*	0,68 ± 0,05$^{*\#}$
Каталаза, мкМоль х хв$^{-1}$ х мг білка$^{-1}$	9,01 ± 0,51	12,37 ± 0,98*	10,21 ± 0,62$^{\#}$

Примітка: *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем; $^{\#}$ - $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Дослідження поліфенольних сполук підтверджують отримані нами результати. Показано, що поліфенольні сполуки захищають від *H. Pylori*–залежного оксидативного ураження ліпідних оболонок СОШ активними формами кисню (АФК). Антиоксидантна активність аллілпірокатехолу та епігалокатехіну опосередкована зниженням продукції АФК моноцитами та макрофагами, а також пригнічення АФК / NF-кБ шляху в тканинах шлунку

[256].Поліфенольні сполуки екстраговані з яблук підвищують експресію глутатіон-С-трансферази, що відіграє роль антиоксиданту СОШ.

При дослідженні антиоксидантнх властивостей НДЦ в результаті інтенсифікації перекисного окислення ліпідів у другій групі (стрес+вода) спостерігалась, активація ферментів антиоксидантного захисту. Так активність каталази зростала на 159.26% ($p < 0,05$) тоді як активність СОД знизилась на 26,09% ($p < 0,05$) порівнянні з інтактною групою щурів (рис. 3.13.).

Активність СОД у групі введення НДЦ зросла на 29.41 % ($p<0.05$) тоді як активність каталази знизилась на 35.29 % ($p<0.05$) відповідно до показників групи стрес-контролю. Ці результати можуть бути пов’язані з СОД – КАТ-міметичними властивостями НДЦ. Як раніше зазначалося, НДЦ з рівнем окислення (Ce^{3+}), демонструє СОД-міметичну активність, що імітує тим самим каталіз дисмутації супероксидрадикалу аніону в живих клітинах.

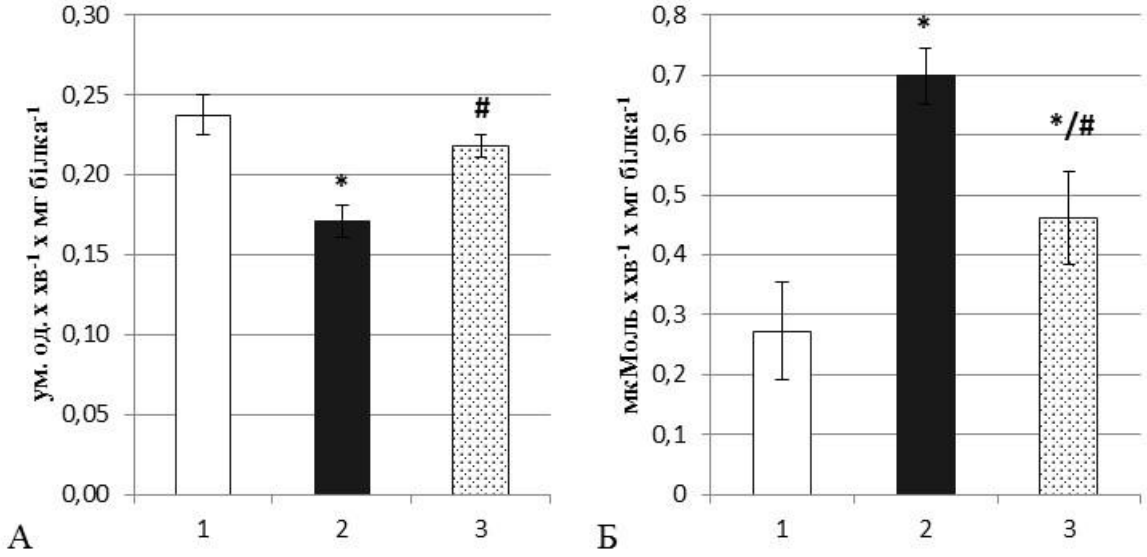

Рис. 3.13. Активність СОД (А) та каталази (Б)у гомогенаті слизової оболонки шлунку щурів за умов дії стресу та профілактичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг в.ш.(M±m): 1- контроль(n=10), 2- стрес і вода(n=10); 3- стрес і НДЦ(n=10)

Примітка: * - $p<0,05$ у порівнянні з контролем; # - $p<0,05$ у порівнянні з контролем

Наявність іонів з рівнем окислення +4 (Ce^{4+}), на поверхні НДЦ, демонструє КАТ-міметичну активність здатність до розкладання H_2O_2 на кисень і воду [170], [251]. Відомо, що автоокисления адреналіну в лужному середовищі протікає через стадію утворення супероксидного радикала. Дослідниками вперше показано, що нанодисперсний діоксид церію пригнічує даний процес за механізмом дії СОД; швидкість процесу інгібування при цьому також залежить від розміру частинок і pH розчину [156]. Припускається що АФК при контакті з іонами Се на поверхні НДЦ розкладаються через внутрішню окисно-відновну здатності Ce^{3+}/Ce^{4+} пари[156]. На основі наших досліджень наявність Ce^{3+}/Ce^{4+} пари може так само впливати на регуляцію концентрації H_2O_2, що чинить захисний вплив на ураження СОШ[180].

3.3. Встановлення антизапальних властивостей досліджуваних речовин

3.3.1. Визначення впливу меланіну та НДЦ на лейкоцитарну формулу крові щурів

Імунологічну реактивність лейкоцитів крові можна схарактеризувати їхніми морфологічними особливостями, структурною організацією та функціональним станом [257]. За кількісно-якісною оцінкою змін лейкоцитарної формули периферійної крові формуються уявлення про адаптаційні реакції організму. Інтегральні гематологічні індекси, за основу яких узято визначення співвідношення клітин формули крові, дають змогу в динаміці оцінити стан неспецифічної та специфічної ланок імунітету, визначити ступінь інтоксикації організму та ефективність терапії низки захворювань [258]–[260]. Таким чином, показники лейкоцитарної формули крові є важливими додатковими методами дослідження захворювань різної етіології, у тому числі й патологій, що викликані дією стресу на організм («психосоматичні захворювання»). У медичній практиці традиційними психосоматичними захворюваннями вважають нейродерміти, бронхіальну астму, псоріаз, виразки 12-палої кишки і шлунку, тиреотоксикоз, коронарну хворобу, ревматоїдний артрит, діабет і часті простудні захворювання [261]–[263]. У зв’язку з цим нами було поставлено мету дослідити вплив профілактичного введення меланіну на показники лейкоцитарної формули крові у щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразкових уражень шлунку.

Встановлено, що в результаті дії стресу, викликаного нервово-м’язовим напруженням за Сельє, у досліджуваних зразках спостерігалася зміна відсотку формених елементів крові. Так, відсоток палочкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів збільшився на 325 % ($p < 0,001$) та 142% відповідно, тоді як відсоток лімфоцитів знизився на 48 % ($p < 0,001$) відносно контролю. (рис. 3.14).

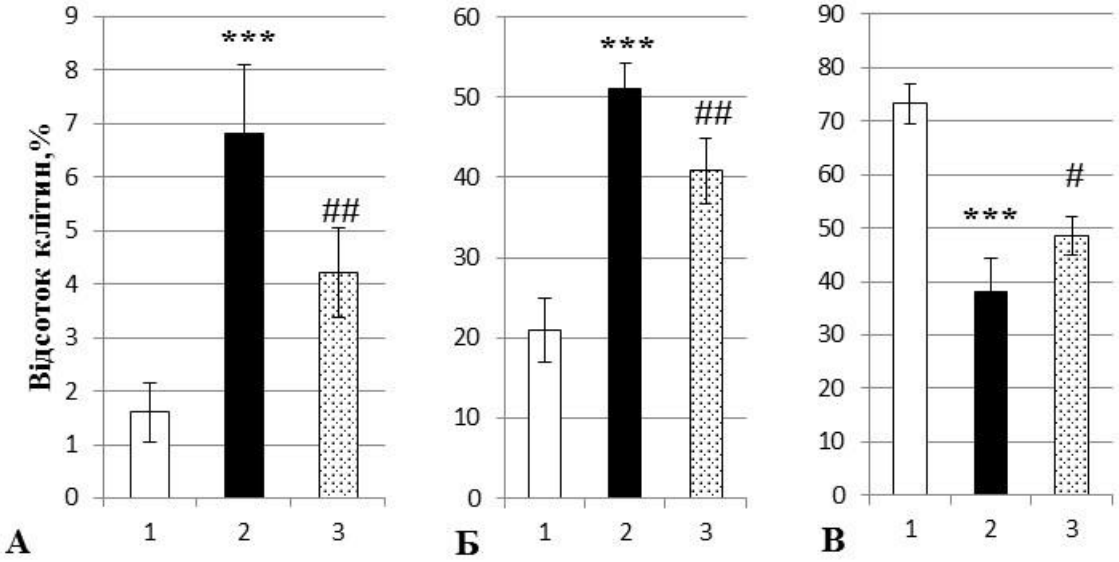

Рис. 3.14. Відсотковий склад палочкоядерних (А) та сегментоядерних (Б) нейтрофілів, а також лімфоцитів (В) крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг в.ш. (M±m):1- контроль(n=10), 2- стрес і вода(n=10); 3- стрес і Меланін (n=10)
Примітка: *,*** p<0,05, p<0,001 у порівнянні з контролем, #,## p<0,05, p<0,01 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Профілактичне введення меланіну призводило до зменшення відсотка палочкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів на 39 % ($p < 0,01$) та 20 % ($p < 0,01$) відповідно до групи стрес-контролю. Вміст лімфоцитів у групі щурів яким перед нанесенням стресу вводили меланін відновлювався на 27 % ($p < 0,05$) відносно групи стресу. Отриманий результат корелює з антизапальним впливом поліфенольго комплексу алілпірокатехолу, який інгібує інфільтрацію лейкоцитів, а також їх взаємодію з шаром ендотелію через супресію молекул адгезії (Е-селектин, П-селектин, і судинний комплекс адгезії VCAM-1), що зменшує запальну реакцію в СОШ [264].

При встановленні протизапальних властивостей НДЦ, після моделювання стресу в другій групі (стрес+вода), було відзначено збільшення відсотку

паличкоядерних нейтрофілів на 280% і сегментованих нейтрофілів на 237,5% і зменшення відсотоку лімфоцитів у крові щурів на 64% (рис. 3.15.).

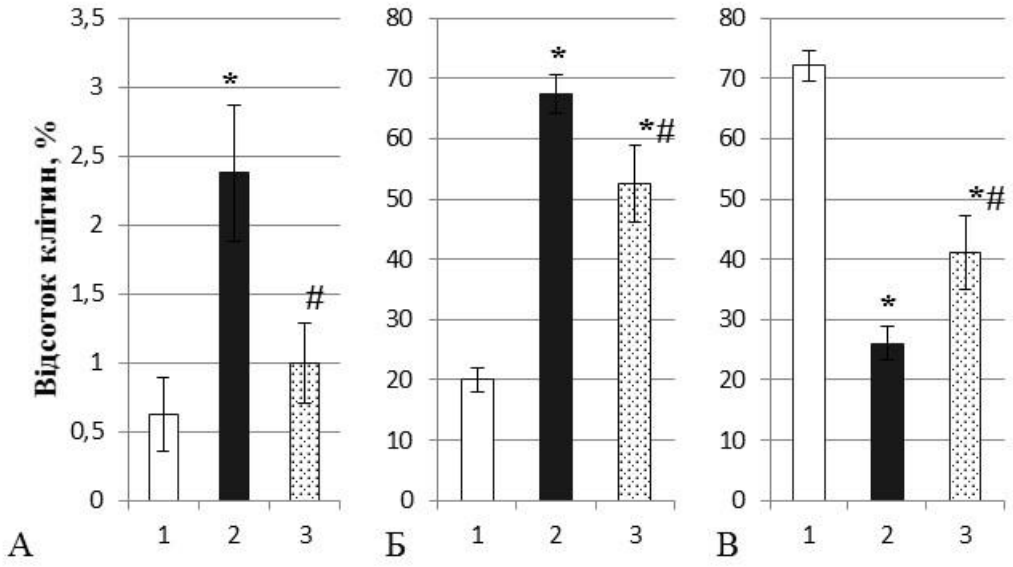

Рис. 3.15. Відсотковий склад палочкоядерних (А) та сегментоядерних (Б) нейтрофілів, а також лімфоцитів (В) крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг в.ш. (M±m):1- контроль (n=10), 2- стрес і вода (n=10); 3- стрес і НДЦ (n=10)

Примітка: * - $p<0,05$ у порівнянні з контролем; # - $p<0,05$ у порівнянні з контролем

Профілактичне введення НДЦ знижувало відсоток паличкоядерних нейтрофілів на 58% ($p<0,05$) і відсоток сегментоядерних нейтрофілів на 22,3% ($p<0,05$). У группі НДЦ було показано збільшення відсотка лімфоцитів на 58.24% ($p<0,05$) порівняно з групою стресу+вода. Отримані результати свідчать про ослаблення запального процесу під впливом тестованої сполуки в умовах стресу.

Отже профілактичне введення меланіну та НДЦ призводить до зменшення запальної реакції організму щурів.

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

Стрес, як фізичний, так і психологічний, здійснює значний вплив на імунну систему людини і тварин[265], [266]. Ушкодження СОШ за умов дії стресу викликає запалення та призводить до активації імунної відповіді. У першу чергу включаються регуляторні Т-лімфоцити – Т-хелпери 1 типу, які підвищують активність макрофагів. Останні продукують прозапальні цитокіни – інтерферону (ІНФ) - γ, інтерлейкіни (ІЛ)– ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6 та ін. Дані прозапальні цитокіни посилюють уражуючий вплив стресу на СОШ[267]. Наукові дослідження, а також клінічні дані переконливо вказують на роль соціального стресу в активації, на транскрипційному рівні, генів прозапальних цитокінів, які в свою чергу викликають нейро-поведінкові зміни організму через вплив на ЦНС [268]. Так у пацієнтів за умов впливу соціального стрес-тесту Тріра, відмічалося збільшення маркерів периферичного запалення, в тому числі інтерлейкіну-6 (IL-6) і ядерного фактора (NF-кБ) в порівнянні з контрольною групою. Крім того у пацієнтів з посттравматичним стрес-розладом (ПТСР) і обсесивно-компульсивним синдромом спостерігалось збільшення IL-6 і фактор некрозу пухлини альфа (TNF-α) [269]. Згідно гіпотези Salim et al 2016 оксидативний стрес може бути основною ланкою, що пов'язує запальний процес з впливом на організм соціального стресу і нервово-психічних захворювань[255]. Стрес-індукована оксидативна активність звільняє збудливу амінокислоту, глютамат, в головному мозку, який індукує вивільнення прозапальних цитокінів, таких як TNF-α. Стрес також активує прозапальний NF-kB шлях через TNF- α -залежний механізм. Фактор транскрипції NF-kB, як відомо, активується АФК, цитокінами і глутаматом, і вважається медіатором окисного стресу при нейродегенеративних процесах, а також відповідальним за індукцію прозапальних цитокінів. NF- кБ активація регулює експресію і активність прозапальних ферментів, таких як індуцібельна

NOS (NOS- 2) і ЦОГ-2. Результатом цього є накопичення окисних і нітрозативних медіаторів, які взаємодіють з мембранними фосфоліпідами, викликаючи пошкодження клітин шляхом перекисного окислення ліпідів. Даний вплив було показано в тканинах мозку після дії стресу[255], [270].Тому наступною нашою задачею було дослідити вплив меланіну та НДЦ на вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії нервово-м'язового напруження та введення досліджуваних сполук.

Встановлено, що в результаті дії стресу, в сироватці крові щурів зростав вміст прозапальних цитокінів. Так, у групі стрес+вода рівень ІЛ-1β становив 0,735±0,042 у.о., що перевищувало контрольні показники на 34,7% ($p<0,001$) (рис. 3.16 а). Вміст ІЛ-12В р40 під впливом стресу зростав до 0,460±0,021 у.о., що на 27,9% ($p<0,01$) перевищує рівень інтактногоконтролю. (рис. 3.16 б). Моделювання стресу також призводило до збільшення рівня ІНФ-γ на 49,7%($p<0,01$) (рис. 3.17 а).

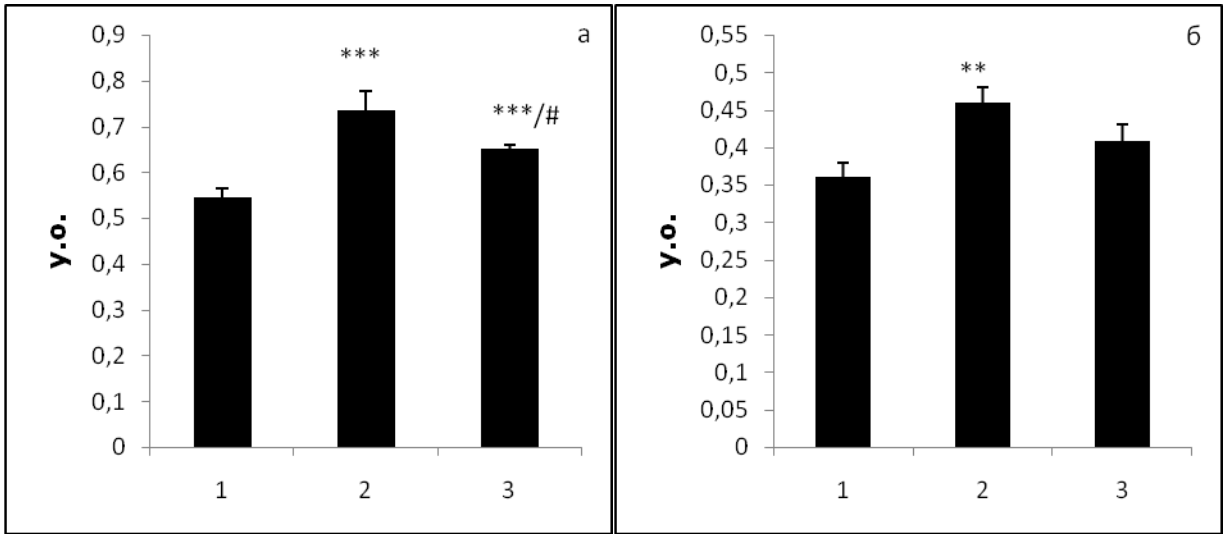

Рис 3.16. Вміст інтерлейкіну 1β (а) та інтерлейкіну 12В р40 (б) в сироватці крові щурів за умов дії стресу та профілактичного введення меланінув.ш. (M±m):

1 – інтактний контроль (n=10), 2 – стрес+вода(n=10), 3 – стрес+меланін(n=10).

Примітка:**, *** – p<0,01, p<0,001 щодо інтактного контролю; # – p<0,05 щодо стрес-контролю.

Меланін, за умов його введення за 30 хв до моделювання стресу, зменшував вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів. Так, рівень ІЛ-1β знижувався до 0,651±0,009 у.о., або на 11,5% (p<0,05) щодо до групи стрес+вода (рис. 3.16 а). Хоча вміст даного інтерлейкіну залишався більшим за відповідний показник інтактних щурів. Вміст ІЛ-12В р40 зменшувався до рівня інтактних щурів, проте значущо не відрізнявся від групи стрес+вода (рис. 3.16 б). Подібні результати були виявлені щодо вмісту ІНФ-γ: даний цитокін при введенні меланіну значущо не відрізнявся як від групи інтактного контролю, так і стрес+вода (рис. 3.17 а).

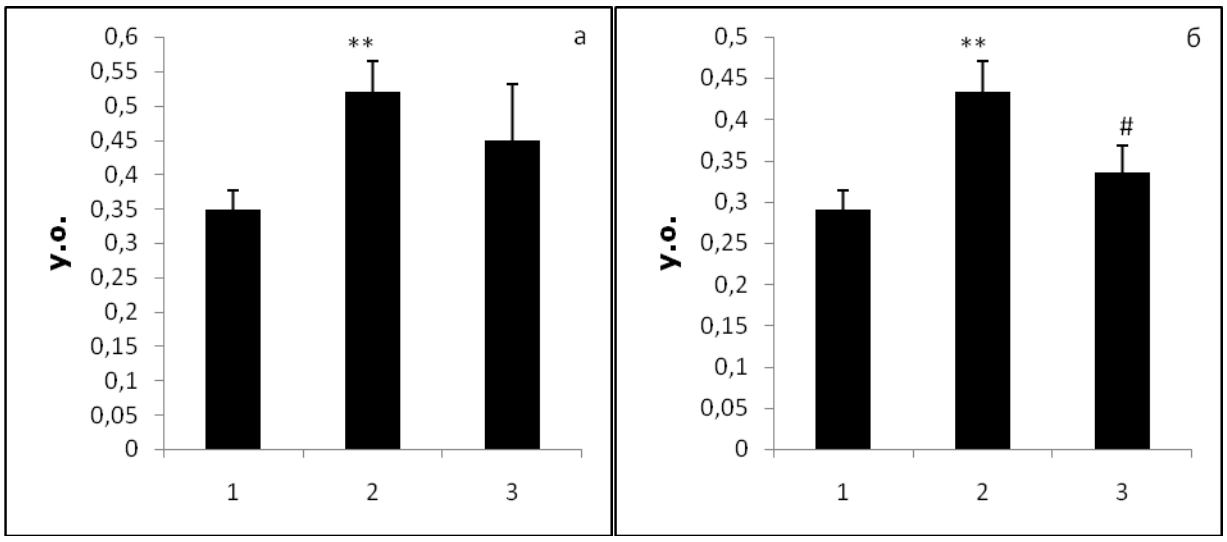

Рис. 3.17 Вміст інтерферону γ (а) та трансформуючий фактор росту-β (б) в сироватці крові щурів за умов виразкоутворення, викликаного нервово-м'язовим напруженням за Сельє, та введення меланіну в.ш. (M±m):
1 – інтактний контроль (n=10), 2 – стрес+вода (n=10), 3 – стрес+меланін (n=10)
Примітка:** – p<0,01 щодо інтактного контролю; # – p<0,05 щодо стрес-контролю.

При дослідженні рівня антизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 та TGF-β після нервово-м'язового напруження за Сельє встановлено, що вміст ІЛ-4 після стресу незначно підвищувався на 16,1% ($p<0,05$) щодо інтактного контролю (рис. 3.18 а). Це може бути компенсаторною реакцією імунної системи у відповідь на запальну реакцію за умов стресу. Вміст ІЛ-10 в сироватці крові щурів одразу після дії стресу не змінювався (рис. 3.18 б). За умов дії стресу вміст TGF-β також був підвищений на 49,6% с порівняно з інтактним контролем ($p<0,01$) (рис. 3.17 б).

Найбільш значний вплив меланін здійснював на вміст TGF-β. В групі стрес+меланін даний показник складав 0,335±0,034, що менше на 23,0% ($p<0,05$) порівняно з групою стрес+вода та не відрізняється від рівня інтактних щурів (рис. 3.17 б).За умов введення меланіну вміст ІЛ-4 в групі стрес+меланін становив 0,194±0,015 у.о., що більше на 22,3% ($p<0,05$) щодогрупи стрес+вода та на 42,1% ($p<0,01$) щодо інтактного контролю (рис. 3.18 а). Меланін також підвищував показники вмісту ІЛ-10 на 27,1% ($p<0,05$) порівняно з групою стрес+вода і на 21,1% ($p<0,01$) порівняно з інтактним контролем (рис. 3.18 б).

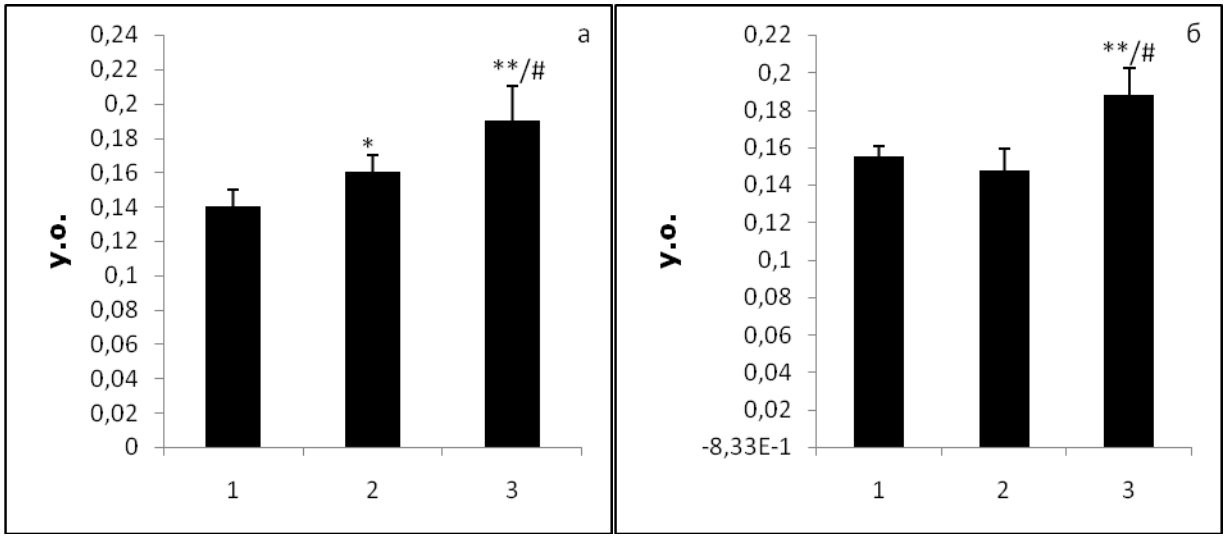

Рис. 3.18 Вміст інтерлейкіну 4 (а) та інтерлейкіну 10 (б) в сироватці крові щурів за умов виразкоутворення, викликаного нервово-м’язовим напруженням за Сельє, та введення меланіну в.ш. (M±m, n=10): 1 – інтактний контроль (n=10), 2 – стрес+вода (n=10), 3 – стрес+меланін (n=10).

Примітка:*, ** – $p<0,05$, $p<0,01$ щодо інтактного контролю; # – $p<0,05$ щодо групи стрес+вода.

Отже, отримані результати свідчать про антизапальний вплив досліджуваної сполук за умов введення її перед моделюванням стресу. Посилення виділення ІЛ-4 та ІЛ-10 під впливом меланіну може бути одним з механізмів зменшення вмісту прозапальних цитокінів ІЛ-1β, ІЛ-12В р40, ІНФ-γ в сироватці крові щурів за умов стресу. Вивчення властивостей поліфенольних соплук підтверджує отримані результати. Так підвищення експресії трансформуючого фактору росту (TGF)-β [21] є одними з основних молекулярних механізмів дії поліфенольного комплексу куркуми (*Curcuma longa)* куркуміну в тканинах шлунку. Виноградний екстракт поліфенолів (з насіння і шкірки) показали антизапальний ефект *H. Pylori*-ініційованому запальному процесу тканин шлунку шляхом супресії прозапальних цитокінів TNF-a, IFN-γ, та IL-8 і розвитку клітинної і ядерної сигналізації МАРК, а також модулюючи транскрипціні шляхи TLR4 [271]. Алілпірокатехол та епігалокатехін галат, поліфенольний комплекс зеленого чаю, запобігає TNF-α стимульованій експресії прозапальних цитокінів, через інгібування NF-$_k$Б внутрішньоклітинної сигналізаціїзапалення, I$_k$B фосфорилювання, а також МАРК-сигнального каскаду регуляції транскрипції і трансляції білків, що беруть участь в запальному процесу [272]

При дослідженні антизапальних властивостей НДЦ, нами було показано, в групі стрес+вода, запалення викликане моделюванням стресу супроводжувалось синтезом прозапальних цитокінів. Так в групі стрес+вода спостерігалось збільшення рівня IL-1β та IL-12B p40 відповідно на 53,3% ($p<0,05$) та 47,36% ($p<0,05$) відносно інтактного контролю (табл. 3.3).Вміст INF-γ у сироватці крові щурів стрес+вода на 44.82% ($p<0,05$) був більшим порівняно з інтактними щурами.

Таблиця 3.3

Рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії стресу та профілактиктичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг (M±m)

Показники	**Контроль**(n=10)	**Стрес+вода (**n=10)	**НДЦ+Стрес (**n=10)
IL-1β, у.о.	0.150±0.15	0.240±0.011*	0.197 ±0.010*/#
IL-12B p40, у.о.	0.382±0.048	0.565±0.049*	0.452±0.035#
INF-γ, у.о.	0.291±0.038	0.428±0.046*	0.318±0.034#

Примітка: * – p<0,05 відносно інтактного контролю, # – p<0,05 відносно групи стресу, якій вводили воду.

Профілактичне введення НДЦ зменшувало рівень IL-1 на 21% (p <0,05) та ІЛ-12В p40 на 20% (p <0,05) в порівнянні з групою стресу+вода (табл. 3.3.). Профілактичн введення НДЦ характеризувалося зниженням рівня INF- γ на 26,2% (p <0,05) (табл. 3.3).

Вміст антизапальних цитокінів (IL-4, IL-10, TGF-β-) у сироватці щурів в умовах стресу значущо відрізнялася від інтактних щурів. Профілактичне введення НДЦ значно підвищило рівень IL-4 (19,4%, p<0,05) в порівнянні з групою стрес+вода. Рівень IL-10 в групі НДЦ збільшувався на 34% (p<0,05) порівняно з групою стрес+вода. За умов введення НДЦ та моделювання стресу рівень TGF-β зростав на 32,25% (p<0,05) у порівнянні з групою стрес+вода.Отримані дані можна пояснити за результатами Xu et al 2016 де автори показали, що НДЦ здатний інгібувати реакції запалення гіпоталамусу за допомогою регулювання взаємозв’язку між NF-кВ сигналізацією і Nrf2 шляхом[273]. Ядерний еритроїд 2-зв’язаний фактор (Nrf2) грає важливу роль в регуляції оксидативного стресу шляхом взаємодії з NF-кВ сигнальною системою. Так дефіцит Nrf2 блокує негативний зворотний зв'язок NF-кВ сигналізації, що збільшує прозапальний ефект. Крім того, ряд досліджень вказують на те що дефіцит Nrf2 призводить до загострення цитотоксичної дії

стресу на організм тварин [274]. Крім запальних реакцій, дефіцит Nrf2 призводить до значного посилення активності TNF-α, IL-6, IL-1β; в сироватці крові, печінки і гіпоталамусі мишей (табл.3.4). Вестерн блот, а також імунофлуоресцентний аналіз, проведені Xu et al. 2016, показали, що процес транспортування безпосередньо NF- кВ в ядро блокується під час введення НДЦ, що призводить до зменшення продукції прозапальних цитокінів. Також дослідниками було виявлено, що наночастки оксиду церію не тільки пригнічують NF-кВ сигналізацію, але і підсилюють активацію Nrf2 шляху, що вказує на оксид церію проявляє протизапальний ефект в тканинах гіпоталамуса шляхом інгібування активації астроцитів та пов'язаної з ними NF- кВ та Nrf2 сигналізації [273].

Таблиця 3.4.

Рівень антизапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії стресу та профілактиктичного введення НДЦ в дозі 1 мг/кг (M±m)

Показники	**Контроль**(n=10)	**Стрес+вода** (n=10)	**НДЦ+стрес** (n=10)
IL-4, a.u.	0.394±0.047	0.319±0.028*	0.377±0.045
IL-10, a.u.	0.402±0.019	0.384±0.047	0.515±0.057*/#
TGF-β, a.u.	0.400±0.034	0.311±0.034*	0.416±0.051#

Примітка: * – $p<0,05$ відносно інтактного контролю, # – $p<0,05$ відносно групи стресу, якій вводили воду.

Таким чином, отримані дані свідчать про значне ослаблення запальних процесів та активації протизапального захисту при профілактичному введенні меланіну та НДЦ та моделюванні стрес-індукованих виразок шлунку.

3.4. Вплив меланіну на рівень гормонів кортизолу та адренокортикотропного гормону щурів за умов нервово-м'язового напруження

Головна мета синтезу глюкокортикоїдів – реалізація адаптації та підтримка гомеостазу організму під час відповіді на стрес-реакції. Основні функції глюкокортикоїдів такі як підвищення синтезу глюкози та інгібування гострого запалення є реакції на критичні зміни в організмі такі як гіпоглікемія та запальний процес. Нокаутовані за глюкокортикоїдним рецептором (ГР) миші є вдалою моделлю для прояву основних властивостей цих сполук. ГР нокаут призводить до інгібування глюконеогенного обміну речовин в печінці [275]. Дефіцит ГР рецепторів в центральній нервовій системі мишей є причиною депресивних розладів, крім того, видалення ГР в Т-клітинах та макрофагах призводить до збільшення смертності внаслідок порушення регуляції виділення цитокінів у відповідь на запальний процес [276].

Значною мірою через потужну імуносупресорну активність, глюкокортикоїдів, в даний час, в терапевтичних цілях, було розроблено багато їх синтетичних аналогів. Ці сполуки є одними з найбільш часто призначуваних препаратів в сучасному світі. Вони використовуються при раку крові, лікуванні астми, алергічного риніту, неспецифічного виразкового коліту, ревматоїдного артриту, екземи, а також психічних розладів головного мозку. На жаль, через широкий спектр фізіологічних властивостей, підвищений рівень глюкокортикоїдів в крові (фармакологічний, або зумовлений дією емоційного стресу) незмінно супроводжується несприятливими побічними ефектами [277]. Отже контроль концентрації рівня глюкокортикоїдів є важливим маркером стрес-ураження організму.

Встановлено, що в сироватці крові щурів 1-ї групи концентрація АКТГ і кортизолу становила 22,9±3,7 пг/мл (рис. 3.19) та 27,4±3,1 нмоль/л (рис. 3.20) відповідно. У щурів 2-ї групи, через 2 год після дії стресу, концентрація АКТГ зменшилася відносно групи контролю на 56% ($P<0,01$), а кортизолу зросла на

320% (P<0,001), що зумовлено відомим негативним зворотним зв'язком між концентрацією кортизолу в крові і рівнем секреції АКТГ гіпофізом.

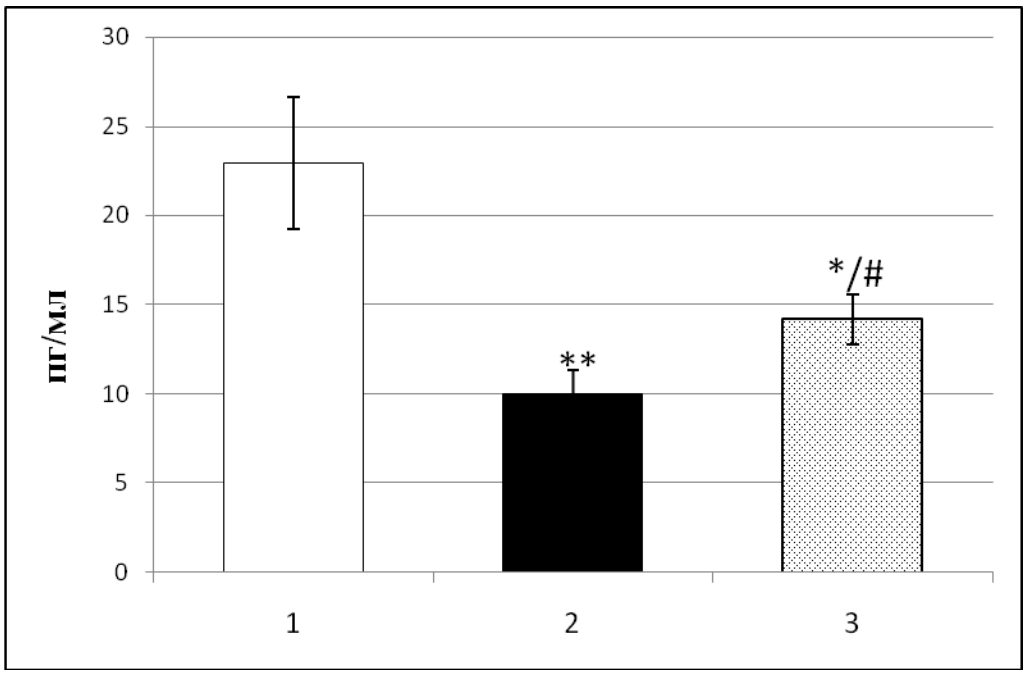

Рис. 3.19. Концентрація адренокортикотропного гормону в плазмі крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг в.ш.(M±m): 1-контроль(n=7), 2-стрес+вода(n=7), 3-стрес і меланін (n=7).

Примітка:* p<0,05, ** p<0,01 у порівнянні з контролем; # p<0,05 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Введення щурам меланіну перед нанесенням стресу викликало підвищення концентрації АКТГ на 42% (p<0,05)та одночасне зниження кортизолу на 19 % (p<0,05) відносно значень 2-ї групи (рис. 3.20).

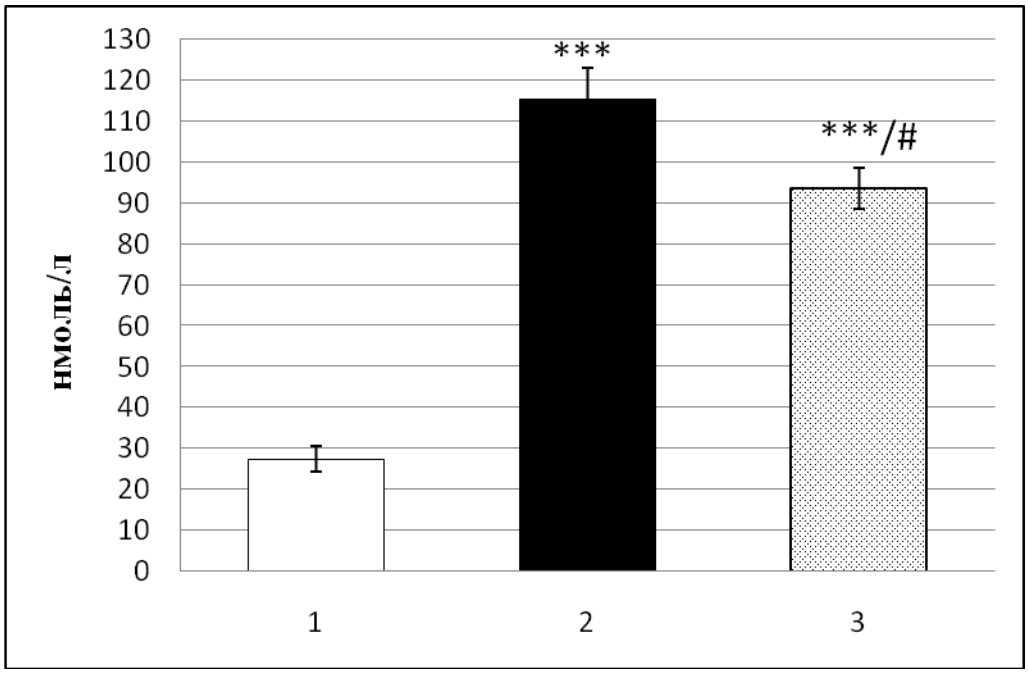

Рис. 3.20. Концентрація кортизолу в плазмі крові щурів після дії нервово-м'язового напруження, за умов профілактичного введення меланіну в дозі 5 мг/кг в.ш. (M±m): 1-контроль(n=7), 2-стрес+вода (n=7), 3-стрес і меланін (n=7). Примітка: *** p<0,001 у порівнянні з контролем, # p<0,05 у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу

Описане зростання концентрації АКТГ пов'язано зі зменшенням зворотного інгібування його секреції при зниженні концентрації кортизолу. Одержані результати узгоджуються з даними Чижанської та співавт., які досліджували адаптогенний вплив меланіну за умов дії хронічного стресу у щурів [216]. Вони показали, що концентрація кортизолу у тварин, яким перед початком досліду вводили пігмент істотно зменшувалася відносно значень у тварин, яким вводили воду. Таким чином, одним з механізмів антистресової дії меланіну є його вплив на гіпофізарно-надниркововозалозну вісь, що призводить до зниження концентрації кортизолу в крові.

При вивченні синтетичного глюкокортикоїду дексаметазону на процеси ураження та гоєння виразки шлунку було показано, що після 9 днів введення 0,2 мг/кг дексаметазону ерозивно-виразкових уражень в СОШ не спостерігалось. Мікроскопічний аналіз, епітелію слизової оболонки не виявив

ознак кровотечі або підвищеного рівня лейкоцитів в СОШ і підслизових шарів шлунку. Проте у групі контролю з моделюванням виразкоутвореня шляхом введення оцтової кислоти спостерігалось значне виразкоутворення. При цьому у групи з моделюванням виразкоутворення та введення дексаметазону розмір виразок збільшувався дозо-залежно [8]. Це говорить про те, що дексаметазон не чинив прямий ульцерогенний вплив, але сповільнював гоєння виразок. Дане дослідження показало, що такий вплив був обумовлений зниженням товщини слизового шару, зниженням рівня проліферації клітин та зниження кількості кровоносних судин у зоні виразкового ураження за умов введення дексаметазону у порівнянні з групою контролю. Зменшення товщини слизового шару може бути пов'язано з пригнічення синтезу циклооксигенази (ЦОГ), ферменту який відповідає за синтез простагландинів і тромбоксану. Регуляція синтезу простагландинів, бере участь в захисті шлунково-кишкового тракту, згортанні крові на ранніх стадіях, цілісності ендотелію судин і гемодинаміки нирок. Інгібування цієї ізоформи відповідає за більшу частину патологічної дії НПЗП [278]. Також показано, що в неушкоджених ділянках шлунку експресія прозапального білка ЦОГ-2 є дуже низька. В ділянках виразкового ураження авторами було показано збільшення експресії ЦОГ-2 в п'ять разів у порівнянні з контролем. Введення дексаметазону призводило до дозо-залежного зменшення експресії ЦОГ-2 тоді як рівень експресії ЦОГ-1 змінювався не значущо в усіх групах тварин. Експресія білку фосфоліпази А2 відповідальної за синтез арахідонової кислоти попередника простагландинів (ПГ), не змінилася значущо у групах з моделювання виразки, проте було показано що у групах введення дексаметазону та моделювання виразки рівень даного протеїну мав тенденцію до зменшення. Рівень ПГ-Е2 в слизовій оболонці шлунку з виразковими ураженнями був у 10 разів вище в порівнянні з інтактними щурами. Введення декскаметазону дозо-залежно знижувало ПГ-Е2 слизвої оболонки в порівнянні з групою контролю (в 2 рази при дозуванні 0.2 мг/кг). Слід зазначити, що введення авторами ПГ-Е2 в дозі 100 та 200 мкг/кг дозо-залежно проявляло зворотній ефект дії дексаметазону. Це проявлялся у

збільшенні проліферації клітин, а також кількості судин в зоні ураження СОШ [279].

Описані вище результати говорять про те що збільшення ПГ-Е2 в слизовій оболонці шлунку після індукції виразкоутворення в значній мірі пов'язані з активацією ЦОГ-2. Дексаметазон дозо-залежно знижував експресію ЦОГ-2 і формування ПГ-Е2 без впливу на експресію ЦОГ-1 і ФЛП-А, які підтверджують описаний вище механізм. Отже вплив дексаметазону на інгібування ПГ-Е2 пов'язаний з його впливом на зниження експрессії ЦОГ-2. Ці результати узгоджуються з дослідженнями, згідно з якими ЦОГ-1 є конститувною, а ЦОГ-2 є індуцибельною формою по відношенню до цитокінів і факторів росту протягом виразкоутворення [69].

3.5. Визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран

Наявність неспарених електронів у структурі дозволяє реалізовувати меланінам широкий спектр протекторно-регуляторних функцій таких як антиоксидантну[280], фотопротекторну та антирадикальну, блокуючи цитотоксичні короткоживучі вільні радикали[281], нейропротекторну, підвищуючи регенеративну здатність нервових волокон при ураженнях центральної нервової системи за рахунок відновлення кровопостачання уражених тканин[282]. Завдяки властивостям напівпровідника меланін бере участь у біоелектричних процесах в головному мозку [283] та виконує важливу фізіологічну функцію протектора проти дії пероксинітриту, який вважають медіатором нейротоксичних процесів[284].

Таким чином, меланін є ефективним кумулятором «шкідливих» неспарених електронів здатний впливати на хід метаболічних реакцій на різних рівнях організації живого організму, у тому числі мембранному. Однак,

питання про безпосередній вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран, як базисного елемента у ланцюзі трансдукції хімічного сигналу залишається досі не розкритим, що ускладнює інтерпретацію молекулярних механізмів реалізації його біологічної активності. Тому метою даного дослідження є дослідити дозозалежний вплив меланіну на провідність та електричну ємність модельних ліпідних мембран (in vitro).

Формування модельної системи БЛМ дозволило встановити вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу за змінами основних електричних характеристик таких як електрична провідність (G, нСм/см^2) та електрична ємність (С, мкФ/см^2) мембран.

Реєстрація ЦВАХ не модифікованих меланіном БЛМ складали G_0 127,81±29,88 нСм/см^2 та C_0 0,58±0,11 мкФ/см^2 відповідно. Послідовне збільшення концентрації меланіну в розчині електроліту з цис-боку ліпідної мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9}-10^{-6} М відзначалося експоненційним ростом питомої провідності ліпідної мембрани (максимально на 21,2 ± 6,8% при концентрації 10^{-6} М). При концентрації меланіну 10^{-5} М процес збільшення провідності припинявся і навіть відзначалося незначнезменшення її величини (рис. 3.21).

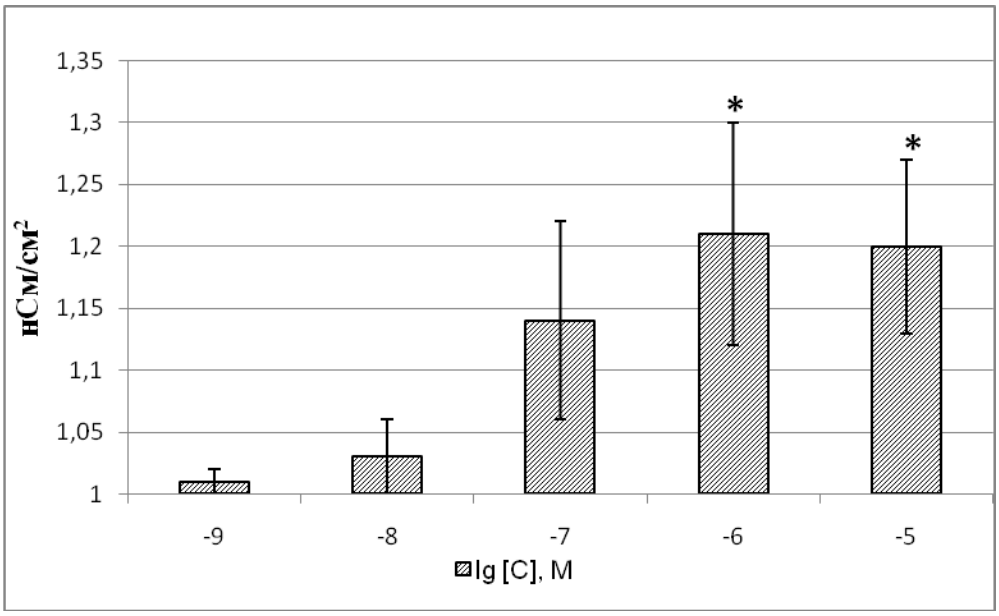

Рис. 3.21 Вплив меланіну на електричну провідність БЛМ (G, нСм/см^2)
Примітка: *- $p<0,05$ у порівнянні з контролем

Електрична ємність мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9}-10^{-6} М зменшувалася (максимально на 8,4 ± 1,7% при концентрації 10^{-6} М). При подальшому збільшенні концентрації меланіну (10^{-5} М) величина електричної ємності стабілізувалася і навіть малатенденцію до зростання (рис.3.22). Отримані результати дозволяють припустити, що молекули меланіну при контакті з ліпідної мембраною проникають через центральну гідрофобну зону залишків жирних кислот фосфоліпідів, що призводять до збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшенню товщини його ізоляційної зони, про що свідчить зменшення ємності мембрани.

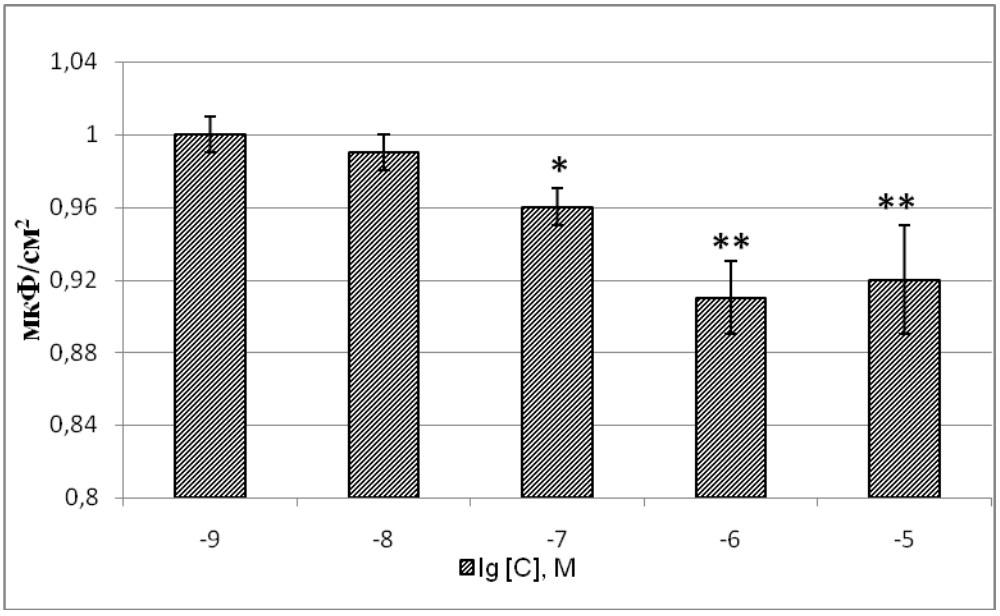

Рис. 3.22 Вплив меланіну на електричну ємність БЛМ (С, мкФ/см^2)

Примітка: *- p<0,05, **- p<0,01 у порівнянні з контролем

Процес прямо залежить від концентрації мембранотропного агенту (меланіну). Однак, при концентраціях меланіну 10^{-5} М його дезорганізуючий вплив на ліпідний бішар поступово нівелюється, що можна пов'язати з можливістю самопригнічення (накопиченням на поверхні або в об'ємі мембрани достатньої кількості меланіну для формування додаткового структурного або електростатичного бар'єру).

УЗАГАЛЬНЕННЯ

ВХ є одним із захворювань внутрішніх органів, яке в світі зустрічається найчастіше.За даними Центру статистики Міністерства охорони здоров'я України, щорічно на диспансерному спостереженні знаходяться майже 1 млн хворих на ВХ, кожний другий лікується в стаціонарі, більше третини користуються листком непрацездатності повторно. Абсолютна кількість випадків ВХв Україні у 2013 р. становила 1 016 276. Показник на 100 тис. населення – 2 239,8 [5].

Складний і багатофакторний патогенез виразкової хвороби досліджувався протягом декількох десятиліть, і результатом було визнана етіологія ВХ через дисбаланс агресивних чинників шлункового соку і захисних функцій слизового бар'єру. Серед основних ульцерогенних факторів виділяють інфекційні запалення (*H. pylori*) та ураження слизового бар'єру шлунку такі як вживання нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) та глюкокортикоїдів, фізичний та емоційний стресс [13].

Поширеність інфекції *H. pylori* серед дорослого населення коливається від 25 до 60% в Європі і до 90% в Австралії і Південній Америці [285]. *H. Pylori* може бути стійкою до будь-якого з препаратів стандартної потрійної терапії, що призводить до зниження ерадикації. Вже в наш час ерадикація найбільш ефективним на сьогоднішній день антибіотиком кларитроміцином становить менше 70%[120]. Arun et al. 2015 було показано, що похідні поліфенольних сполук, біологічні пігменти меланіни ізольовані з грибів *Schizophyllum commune* проявляють антибіотичний ефект проти бактеріальної культури *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus sp*, та *Pseudomonas fluorescens*, а також дерматофітних грибів *Trichophyton simii* та *T. Rubrum*[27]. Показано, що

меланіни клітинної стінки *Phellinus weirii* або з культурального середовища актиноміцетів є ефективним антибіотиком[27].

Стандартне інгібування секреції соляної кислоти ІПП має важливе значення для стабільності антибіотикотерапії ВХ, а також захисту СОШ від гіперсекреції соляної кислоти, що є фактором ускладнення виразкових уражень різного ґенезу. Проте серед багатьох побічних ефектів вживання ІПП може призвести до колонізації СОШ іншою бактеріальною флорою, вірусами та навіть грибами[120], [286]. Савицьким та співав. 2002 було показано, пероральне введення меланіну гальмувало стимульовану гістаміном секрецію соляної кислоти в шлунку щурів. Наведені результати вказують на гіпосекреторну та антибактеріальну дію меланіну, що є ключовими стратегіями у лікуванні *H.pylori* та НПЗП-асоційованого ураження шлунку[25].

Показано, що в 16%-31% випадків ВХ може розвиватись у *H. pylori* негативних пацієнтів які не проходять курс лікування НПЗП[42], [48], [9]. У більшості людей колонізація, *H. Pylori* не викликає жодних симптомів[178]. Головну роль у виразкоутворенні сучані дослідження відводять впливу стресу на організм людини. Стрес може виступати, як основним етіологічним чинником ВХ так і фактором ускладнення виразки обумовленої *H. pylori,* НПЗП, курінням та низьким соціоекономічним статусом[48]. Є переконливі докази, ключової ролі психоемоційного стесу у розвитку виразквої хвороби [50].Згідно з останнім визначенням Ганса Сельє, автора теорії стресу, ключова роль в розвитку стрес реакції організму належить гіпоталамо-гіпофізарно-надниркововзалозній (ГГН) осі, а конкретніше корі наднирників, що синтезують глюкокортикоїди у відповідь на стрес-фактор [52]. Показано, що підтримка фізіологічної концентрації глюкокортикоїдів забезпечує регуляцію кровопостачання шлунку, а також попереджає виникнення процесів запалення. Це обумовлено анти-запальними властивостями глюкокортикоїдів, що за умов гострого стресу чинять інгібування адгезії нейтрофілів, що є основним фактором уражень шлунку за умов дії нестероїдних протизапальних препаратів [62]. Подібна імуномодулююча дія притаманна ПОМК-похідному

нейропептиду α-МСГ. Його протизапальна дія пов'язана з експресією MC1R α-МСГ рецепторів на клітинах лейкоцитів. Введення α-МСГ інгібує продукування та вплив прозапальних агентів (IL-1, IL-6, TNF- α, INF-γ) та активує синтез імуносупресора IL-10 [287]. Екзогенне введення даного гормону чинить гастропротекторний вплив за умов етанол-індукованих уражень слизової оболонки шлунку (СОШ) [288]. Встановлено, що α-МСГ за умов стресу через MC4R рецептори гіпоталамуса пригнічує виділення кортикостероїдів, що зменшує надмірну відповідь організму на хронічний стрес [289]. Однією з основних функцій даного гормону є посилення меланогенезу клітинами-меланоцитами. Відомо, що екзогенно введений меланін здійснює профілактичний вплив на ураження в шлунку щурів, викликані хронічним стресом [216], [290]. Отже вплив α-МСГ на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову систему є встановленим фактом, проте повідомлення щодо впливу меланіну, як основного продукту синтезу α-МСГ, на основні ланки стреслімітуючої системи залишаються поодинокими. Є відомості що у щурів при введенні меланіну на тлі хронічного стресу вміст кортизолу зменшується [216]. Проте залишається нез'ясованим вплив меланіну на рівень АКТГ, що дозволило б більш повно охарактеризувати вплив меланіну на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову систему, адже АКТГ і кортизол пов'язані контуром взаємної регуляції.

На першому етапі експерименту нами було проведене дослідження впливу профілактичного введення меланінуна ураження СОШ щурів викликаних іммобілізаційним стресом за Сельє. Даний метод рекомендований Державним експертним центром МОЗ України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів[31]. У зв'язку з цим було створено три групи тварин. Щури першої групи слугували контролем (інтактні тварини). Щури другої і третьої групи були піддані дії стресу. Їм перед нанесенням стресу внутрішньошлунково (в/ш) вводили 0,5 мл води (група 2) та меланін в дозі 5 мг/кг, розчинений в 0,5 мл води (група 3). Нами було встановлено, що меланін на 64% ($p<0,05$) зменшував площу виразок,

викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє(рис. 3.1). Що стосується ерозій, то при зменшенні їх довжини спостерігалася лише тенденція до зменшення. Отримані дані узгоджуються з результатами Чижанської та спів. 2005 де дослідники показали гастропротекторний вплив меланіну з чорних дріжджів штаму *Nadsiniella nigra var. Hesuelica*[126]. Авторами було встановлено, що меланін на 100 % захищав слизову оболонку шлунку від уражень викликаних водно-імобілізайною моделлю стресогенезу. Даний вплив автори пов'язують з підвищенням концентрації оксиду азоту (NO) та ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) встановлених в сироватці крові за умов профілактичного введення меланіну [32]. Синтез NO запобігає вазоконстрикторному ефекту лейкотрієну C_4, тромбоксану А2, та ендотеліну, а також запобігає адгезії тромбоцитів і лейкоцитів до мікросудинного ендотелію, тим самим запобігаючи порушенню мікроциркуляції [125].

В наведених дослідженнях не було досліджено вплив меланіну на слизовий бар'єр шлунку. Активація імунної відповіді й запального процесу збільшує системний вміст глюкокортикоїдів, що за умов їх надмірного впливу призводить до зниження синтезу мембранних ліпідів та простагландинів[233]. Це зумовлює зниження утворення колагену та сполук ЕЦМ (фібронектин, глікозаміноглікани, протеоглікани та гіалуронова кислота), тоді як їх наявність в СОШ у вільній формі може вказувати на патологічні зміни слизової оболонки, що супроводжуються руйнуванням сполучної тканини власної пластинки слизового бар'єру.При цьому ускладнюється процес відновлення слизового бар'єру та рубцювання виразкових уражень[234], [235]. Було встановлено, що за умов дії стресу відбувається руйнування слизового бар'єру, що виявляється у зростанні концентрації вільного оксипроліну на 73,2% ($P<0,001$), що свідчить про активацію колагенолітичних процесів, фукози на 55% ($P<0,001$) та гексуронових кислот на 75% ($P<0,001$) порівняно із групою контролю. При введенні меланіну вміст вільного оксипроліну в СОШ значущо знижувався на 29% ($P<0,001$) порівняно з 2-ю групою щурів. Hasebe та співавт. [235]показали важливість оксипроліну як одного з основних маркерів ульцерогенезу за умов

водно-іммобілізаційного стресу. Тоді як інші автори [236] відмічають необхідність колагену у клітинній диференціації та швидкості гоєння виразкових уражень при етаноліндукованому ульцерогенезі. При профілактичному введенні меланіну, спостерігалося статистично значуще зменшення вільної фукози в пристінковому слизі на 16% ($p<0,001$) порівняно з 2-ю групою щурів. Таким чином, меланін запобігає деградації фукопротеїнів сполучної тканини слизово-епітеліального бар'єру шлунку за умов дії стресу. При профілактичному введенні меланіну цей показник зменшувався на 24% ($P<0,001$) порівняно з щурами, яким вводили воду (рис. 3.5). Наші результати свідчать, що меланін ефективно захищає СОШ від деградації глікозаміногліканів. Отже, профілактичне введення меланіну попереджувало деполімеризацію колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу СОШ, свідченням чого є зменшення відповідно концентрації вільного оксипроліну, фукози та гексуронових кислот. При цьому цілісність слизового бар'єру була наближеною до значень контрольних щурів, що узгоджується з результатами макроскопічного аналізу СОШ.

Основними факторами стрес-ідукованого ураження слизової визнано зниження кровотоку слизових оболонок (ішемія) і як наслідок реперфузійне пошкодження тканин в умовах оксидативного стресу[43]. За фізіологічних умов рівень продуктів ПОЛ ефективно регулюється роботою антиоксидантної системи (АОС), яка забезпечує підтримання рівноваги між про та антиоксидантними процесами[291]. Проте занадто висока активність процесів ПОЛ може призвести до пригнічення активності систем АОЗ. В цьому випадку в клітинах розвиваються описані раніше патологічні процеси, які починаються на рівні плазмалеми і переходять на внутрішньоклітинні структури. Нині є загальновизнаним, що розвиток окисного стресу є універсальним неспецифічним механізмом клітинного пошкодження при різних захворюваннях. Все це може призвести до загибелі клітини шляхом некрозу або апоптозу[134]. Встановлено, що в СОШ щурів після дії стресу вміст первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів зростав на 63% ($p<0,05$). При визначенні

проміжних продуктів ПОЛ у СОШ щурів стрес збільшував утворення ТБК-активних продуктів на 98,5% ($p<0,05$). Через дві години після дії стресу рівень Шиффових основ перевищував показник в контролі на 82% ($p<0,05$). У щурів, яким перед нанесенням стресу вводили меланін, рівень дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів та Шиффових основ не відрізнявся від контрольних значень.

Важливими ферментами антиоксидантної системи є СОД, яка перетворює супероксидний радикал у перекис водню, та КАТ, яка інактивує утворений з СОД пероксид водню. Завдяки спільній роботі цих ферментів вміст активних форм кисню тримається в межах фізіологічної норми. Встановлено, що за умов дії іммобілізаційного стресу, у гомогенаті СОШ щурів активність СОД та КАТ зростала відносно контролю. Профілактичне введення меланіну стресованим щурам сприяло збільшенню активності СОД, при цьому рівень КАТ був в межах контрольних значень. Отже, меланін виступає стабілізатором рівня атиоксидантного захисту організму, активуючи фермент антиоксидантного захисту (СОД), а також виявляючи власні стреспротекторні властивості, запобігаючи уразливій діяльності активних форм кисню, на що вказує відновлений рівень продуктів ПОЛ та стабілізація рівня КАТ активності.

Питання про безпосередній вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран, як базисного елемента у ланцюзі трансдукції хімічного сигналу залишається досі не розкритим, що ускладнює інтерпретацію молекулярних механізмів реалізації його біологічної активності. Тому нами було досліджено дозозалежний вплив меланіну на провідність та електричну ємність модельних ліпідних мембран (in vitro). Послідовне збільшення концентрації меланіну в розчині електроліту з цис-боку ліпідної мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9}-10^{-6} М відзначалося експоненційним ростом питомої провідності ліпідної мембрани. При концентрації меланіну 10^{-5} М процес збільшення провідності припинявся і навіть відзначалося незначне зменшення її величини. Електрична ємність мембрани в діапазоні концентрацій

меланіну 10^{-9}-10^{-6} М зменшувалася. При подальшому збільшенні концентрації меланіну (10^{-5} М) величина електричної ємності стабілізувалася і навіть мала тенденцію до зростання. Отримані результати дозволяють припустити, що молекули меланіну при контакті з ліпідної мембраною проникають через центральну гідрофобну зону залишків жирних кислот фосфоліпідів, що призводять до збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшенню товщини його ізоляційної зони, про що свідчить зменшення ємності мембрани.

Процес прямо залежить від концентрації мембранотропного агенту (меланіну). Однак, при концентраціях меланіну 10^{-5} М його дезорганізуючий вплив на ліпідний бішар поступово нівелюється, що можна пов'язати з можливістю самопригнічення (накопиченням на поверхні або в об'ємі мембрани достатньої кількості меланіну для формування додаткового структурного або електростатичного бар'єру).

Показано, що підтримка фізіологічної концентрації глюкокортикоїдів забезпечує регуляцію кровопостачання шлунку, а також попереджає виникнення процесів запалення[62]. Підвищений рівень глюкокортикоїдів інгібує синтез шлункового слизу, через супресію метаболізму арахідонової кислоти і синтезу простагландинів (ПГ). Глюкокортикоїди посилюють виділення гастрину і призводити до гіперплазії обкладових клітин, через посиленням секреції кислоти [61], [62], [69]. Дослідниками встановлено, що α-МСГ за умов стресу, через MC4R рецептори гіпоталамуса, пригнічує виділення кортикостероїдів, що зменшує надмірну відповідь організму на хронічний стрес [289]. Екзогенне введення даного гормону чинить гастропротекторний вплив за умов етанол-індукованих уражень слизової оболонки шлунку (СОШ)[288].Однією з основних функцій даного гормону є посилення меланогенезу клітинами-меланоцитами. Проте повідомлення щодо впливу меланіну, як основного продукту синтезу α-МСГ, на основні ланки стреслімітуючої системи залишаються поодинокими. Є відомості що у щурів при введенні меланіну на тлі хронічного стресу вміст кортизолу

зменшується[216]. Проте залишається нез'ясованим вплив меланіну на рівень адренокортикотропного гормону (АКТГ), що дозволило б більш повно охарактеризувати вплив меланіну на гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникову систему, адже АКТГ і кортизол пов'язані контуром взаємної регуляції.

Дійсно методом імуноферментного аналізу нами було встановлено, що через 2 год після дії стресу, концентрація АКТГ в сироватці крові щурів зменшилася відносно групи контролю на 56% ($P<0,01$), а кортизолу зросла на 320% ($P<0,001$), що зумовлено відомим негативним зворотним зв'язком між концентрацією кортизолу в крові і рівнем секреції АКТГ гіпофізом. Введення щурам меланіну перед нанесенням стресу викликало підвищення концентрації АКТГ на 42% ($P<0,05$) та одночасне зниження кортизолу на 19 % ($P<0,05$) відносно значень групи стрес+плацебо. Описане зростання концентрації АКТГ пов'язано зі зменшенням зворотного інгібування його секреції при зниженні концентрації кортизолу. Одержані результати узгоджуються з даними Чижанської та співавт., які досліджували адаптогенний вплив меланіну за умов дії хронічного стресу у щурів[216]. Вони показали, що концентрація кортизолу у тварин, яким перед початком досліду вводили пігмент істотно зменшувалася відносно значень у тварин, яким вводили воду.

За Сельє стресогени різної природи (спека або холод, вимушена іммобілізація або фізичні вправи; хімічні, біологічні та психологічні агенти) завжди викликають однакову нейроендокринну (тому, неспецифічну) відповідь, яка полягає у підвищенні секреції адренокортикотропного гормону (АКТГ) гіпофізом, що призводить до підвищеного вивільнення глюкокортикоїдів з надниркових залоз [52]. Відповідь на органному рівні є «тріада стресу», зміни у якій спостерігається навіть на макроскопічному рівні: збільшення надниркових залоз, виразкоутворення шлунково-кишкового тракту і атрофія тимусу, що слугує первинним прогностичним маркером стресу по сьогодні[52]. Встановлено, що у щурів групи стрес-контроюкоефіцієнт маси надниркових залоз зростав на 46% ($0,038\pm0,001$, $P<0,001$) , що свідчить про гіпертрофію

надниркових залоз, яка є результатом підвищеного синтезу та секреції кортикостероїдів, в т.ч. кортизолу. Коефіцієнти маси надниркових залоз щурів, яким перед моделюванням стресу вводили меланін, статистично значущо не відрізнялися від контролю, що підтверджує виражену стреспротективну активність меланіну.

Стрес, як фізичний, так і психологічний, здійснює значний вплив на імунну систему людини і тварин[265], [266]. Ушкодження СОШ за умов дії стресу викликає запалення та призводить до активації імунної відповіді. У першу чергу включаються регуляторні Т-лімфоцити – Т-хелпери 1 типу, які підвищують активність макрофагів. Останні продукують прозапальні цитокіни – інтерферону (ІНФ) - γ, інтерлейкіни (ІЛ)– ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6 та ін. Дані прозапальні цитокіни посилюють уражуючий вплив стресу на СОШ[267].

Доведено імуномоделюючу дію ПОМК-похідного нейропептиду α-МСГ. Його протизапальна дія пов'язана з експресією MC1R α-МСГ рецепторів на клітинах лейкоцитів. Введення α-МСГ інгібує продукування та вплив прозапальних агентів (IL-1, IL-6, TNF- α, INF-γ) та активує синтез імуносупресора IL-10[287]. Проте дослідниками не розглянуто роль продукту синтезу α-МСГ меланіну на цитокін-сигнальну ланку імунної системи за умов дії стресу. Тому наступним завданням нашої роботи було дослідити вплив меланіну на вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії нервово-м’язового напруження та введення меланіну. Профілактичне введення меланіну, за 30 хв до початку дії стресу, зменшував вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів. Так, рівень ІЛ-1β знижувався на 11,5% ($p<0,05$) щодо до групи стрес-контролю. Хоча вміст даного інтерлейкіну залишався більшим за відповідний показник інтактних щурів. Вміст ІЛ-12В р40 зменшувався до рівня інтактних щурів, проте значущо не відрізнявся від групи стрес-контролю. Концентрація ІНФ-γ: після введення меланіну значущо не відрізнявся як від групи інтактного контролю, так і стрес-контролю. Найбільш значний вплив меланін здійснював на вміст TGF-β. В групі стрес+меланін

даний показник був на 23,0% ($p<0,05$) нижчим порівняно з групою стрес-контролю та не відрізняється від рівня інтактних щурів. Як було зазначено активність TGF-β відповідає за ангіогенез та наступний реепітелізаційний процес, запускаючи трансформацію фібробластів сполучної тканини у міофібробласти які сприяють синтезу колагену та сполук екстрацелюлярного матриксу СОШ[233]. Отже вплив меланіну на рівні СОШ може бути пов'язаний з власними гастропроекторними властивостями, що призводить до нормалізації концентрації TGF-β.

При дослідженні концентрації антизапальних цитокінів було встановлено, що профілактичне введення меланіну перед початком моделювання стресу відзначалося підвищеною концентрацію ІЛ-4 та ІЛ-10 на 22,3% ($p<0,05$) та на 27,1% ($p<0,05$) відповідно щодо групи стрес-контролю. Підвищення концентрації ІЛ-4 та ІЛ-10 за умов ввдення меланіну може бути одним з механізмів зменшення вмісту вище наведених прозапальних цитокінів.

Нанесення стресу тваринам вплинуло на зміну відсотку формених елементів крові. Так кількісний вміст нейтрофілів збільшився на 62% ($p<0,001$). Тоді як вміст лімфоцитів знизився на 41% ($p<0,001$) відносно контролю. Введення меланіну не вплинуло на зміну лейкоцитарної формули та кількості лейкоцитів щурів після дії стресу.

Наночастинки оксидів металів (особливо рідкоземельних РЗМ) є дуже схожими з меланінами що до антиоксидантної, фотопротекторної, протипухлинної та ферментативної активності за умов різних патологій [156], [30], [292]. Окрім цього, на відміну від природних стрес-захисних сполук оксиди наночатинок проявляють регенеративну здібність після участі в окисних реакціях, та здатні повторно приймати участь в розриві ланцюгів оксидативного стресу [151]. Серед наноматеріалів особливу увагу приділяють нанокристалічному діоксиду церію (НДЦ). Дійсно, на сьогодні проведена достатньо велика кількість робіт, яка переконливо свідчить про антивиразкову дію та антиоксидантні властивості меланіну та нанокристалічного діоксиду

церію [293]–[295]. Проте в літератрі відсутні дані про порівняння стреспротекторних властивостей даних сполук, а також визначення переваг використання один перед одним для споживачів.

Враховуючи результати першого етапу роботи, наступні дослідження були присвячені порівнянню стреспротекторного впливу нанокристалічного діоксиду церію за умов профілактичного введення та моделювання імобілізаційного стресу за Сельє. У зв'язку з цим було створено три групи тварин. Щури першої групи слугували контролем (інтактні тварини). Щури другої і третьої групи були піддані дії стресу. Їм перед нанесенням стресу внутрішньошлунково (в/ш) вводили 2,9 мл води (група 2) та НДЦ в дозі 1 мг/кг, розведеного в стабілізуючому розчині об'ємом 2,9 мл/кг (група 3). Введення рідин проводили упродовж 10 діб. На 10-ту добу стресові ураження викликали методом нервово-м'язового напруження за Сельє.

Нами було встановлено, профілактичне введення CeO_2 скоротило площу виразок на 41,7% ($p < 0,05$) порівняно з групою стрес-контролю (рис 5.1.). Гастропротекторна дія церію підтверджена, за умов моделювання оксидативного стресу викликаного етаноловою моделлю ульцерогенезу[222]. Показано, що оксиди церію, в порівнянні з іншими рідкоземельними елементами, мають високу абсорбційну здатність молекул H_2[226]. Потрапляючи в шлунок, CeO_2 звязується з клітиними мембранами та інтерналізується в клітину одним з трьох шляхів: піноцитозом, рецептор-регульованим ендоцитозом або фагоцитозом[226]. Таким чином можна припустити, що потрапляючи в парієтальну клітину, наночастинки CeO_2 здатні регулювати вивільнення іонів водню тим самим регулюючи синтез соляної кислоти та зниження її уразливої дії на ушкоджені ділянки СОШ. Це може стати перспективою досліджень використання церію в якості альтернативи препаратам ІПП.

Гранулярна тканина власного шару є ключовим компонентом захисту за умов виразкового ураження СОШ. Гранулярна тканина складається з

проліферуючих клітин сполучної тканини, а саме макрофагів, фібробластів та проліферучих ендотеліальних клітин, які стимулюють процеси реепітелізації та ангіогенез[43]. Фібробласти беручи участь в формуванні екстрацелюлярного матрикусу (ЕЦМ) і колагенових структур, які є основною клітинного росту, міграції та диференціації прилеглих клітин[296]. Нами було встановлено, що розвиток ерозивно-виразкових уражень в СОШ, викликаних нервово-м'язовим напруженням супроводжувався підвищенням деградації колагенових волокон та слизово-епітеліального бар'єру захисних білків. Це супроводжувалось зростанням концентрації вільного гідроксипроліну, фукози і вільних глікозаміногліканів. Терапевтичне введення CeO2 значущо зменшувало вміст вільного оксипролину, фукопротеїнів та гексуронових кислот в слизовому бар'єрі порівняно з другою групою щурів. Таким чином, CeO2 запобігає деградації захисних білків слизу щурів, що була викликана дією стресу. Даний вплив може бути пов'язаний з впливом НДЦ на прискорення загоєння уражених ділянок СОШ шляхом посилення міграції і проліферації фібробластів, кератиноцитів і клітинного ендотелію. Chigurupati et al. 2012 було показано, що обробка культивованих кератиноцитів та фібробластів шкіри розчином НДЦ протягом трьох днів значно підвищувало проліферацію та ріст клітин оброблених НДЦ у порівнянні з контролем[239]. Моделювання термічного ураження епідермісу мишей показало, що у контрольних щурів на тринадцятий день після ураження епітелію діаметр рани становив 1.2 мм тоді як група щурів у яких проводили обробку рани розчином НДЦ на 8 день характеризувалася відсутністю опікових уражень [239].

На сьогоднішній день є доведеним факт, що емоційний стрес нетільки збільшує ризик розвитку депресії, але і підвищує рівень прозапальних цитокінів [255]. Нами було встановлено рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів за умов профілактики CeO2 та моделювання уражень шлунку за допомогою імобілізаційним стресу за Сельє, що найбільш точно відображає механізм емоційного напруження. Профілактичне введення CeO2 зменшувало рівень прозапальних цитокінів IL-1 на 21% ($p < 0,05$), ІЛ-12В p40 на 20% (p

<0,05) та INF-γ на 26,2% (p <0,05) в порівнянні з групою стресу. Профілактичне введення CeO2 значно підвищило рівень антизапальних цитокінв IL-4 (19,35% (p <0,05)), IL-10 34% (p <0,05) та TGF-β (32,25% (p <0,05)) в порівнянні з групою стресу. Отримані дані співпадають з результатами Xu et al 2016 де автори показали, що НДЦ здатний інгібувати реакції запалення гіпоталамусу за допомогою регулювання взаємозв'язку між NF-кВ сигналізацією і Nrf2 шляхом[273]. Також дослідниками було виявлено, що наночастки оксиду церію не тільки пригнічують NF-кВ сигналізацію, але і підсилюють активацію Nrf2 шляху, що призводить до інгібування активності прозапальних цитокнів TNF-α, IL-6, IL-1β; в сироватці крові, печінки і гіпоталамусі мишей[273].

Маркерами залучення ендокринної та імунної системи була зафіксована гіпертрофія надниркових залоз (НЗ) та інволюція тимуса, що є результатом мобілізації захисних резервів організму для відповіді на стрес. Терапевтичне введення НДЦ характеризувалося зниженням ваги НЗ на 22% (p<0,05) і зільшенням ваги тимуса на 23,6% (p <0,05) порівняно з контрольною групою щурів. Хронічний психологічний стрес і психічні захворювання, особливо депресивні розлади (БДР), пов'язують з ослабленням адаптації набутого імунітету. Після моделювання стресу було відзначено збільшення відсотку нейтрофілів (паличкоядерних нейтрофілів на 280% і сегментованих нейтрофілів по 237,5%) і зменшення відсотоку лімфоцитів у крові щурів на 64%. Профілактичне введення НДЦ відновлювало відсоток паличкоядерних нейтрофілів до контрольного рівня і знижувало відсоток сегментоядерних нейтрофілів на 22,3%. Отримані результати підтверджують ослаблення запального процесу під впливом тестованої сполуки в умовах стресу.

Активні форми кисню (АФК) мають ключову роль в патогенезі уражень шлунку. Через це переважним напрямком досліджень ВХ є пошук гастропротекторних препаратів здатних інгібувати метаболічні шляхи кисню[297]. Продукти ПОЛ, що утворюються внаслідок взаємодії біліпідних мембран з АФК, обумовлюють зміни властивостей клітиних мембран, шляхом вставки полярних груп в молекули фосфоліпідів, що знаходяться всередині

подвійного ліпідного шару; таким чином, внутрішня частина ліпідної мембрани стає гідрофобною і більш проникною [298]. ПОЛ також викликає зміни мембранного потенціалу в бік деполяризації. Крім того, пероксидація пригнічує активність білків транспортерів, що призводить до розладу активного транспорту через мембрану[240], [299]. Продукти ПОЛ відповідають за ускладнення патофізіологічних процесів в клітині, тому вимірювання їх концентрації, можна вважати корисним інструментом в експериментальній та клінічні практиці, який відображає рівень пошкодження, викликаного окисним стресом [245]. Нами було встановлено, що після моделювання нервово-м'язового напруження інтенсивність перекисного окислення ліпідів у крові щурів значно збільшилась. Введення НДЦ зменшувало вміст дієнових коньюгатів на 19.15% ($p<0.05$), ТБА-активних продуктів на 25% ($p<0.05$), та шифових основ на 24.4% ($p<0.05$) в слизовій оболонці шлунку у порівнянні з групою стрес-контроль. Зниження вмісту пероксиду водню в слизовій оболонці шлунку на 29.16 % ($p<0.05$) також було показано. Отримані результати узгоджуються з групою Li et al, де було показано що НДЦ значно підвищував проліферацію, а також попереджував апоптоз клітин MC3T3-E1 вікликаний обробкою H_2O_2[251]. Рівень МДА у клітин оброблених H_2O_2 був значущо вищім у порівнянні з контролем. Профілактичне введення НДЦ демонструвало значущо нижчий показник МДА у порівнянні з групою без профілактики [251].

Токсичні ефекти вільно радикального ураження в клітині та міжклітинному середовищі, за звичай, контролюються завдяки активності ферментів супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази та пероксиредоксину, що переривають ланцюги вільнорадикальних процесів[224]. Проте за умов виснаження ендогенних систем захисту набуває актуальності пошук сполук, з аналогічними властивостями. У результаті інтенсифікації ПОЛ в результаті моделювання стресу спостерігалась, активація ферментів антиоксидантного захисту. Так активність каталази зростала на 159.26% ($p <0,05$) тоді як активність СОД знизилась на 26,09% ($p <0,05$) порівнянні з інтактною групою щурів . Активність СОД у групі введення НДЦ зросла на

29.41 % ($p<0.05$) тоді як активність каталази знизилась на 35.29 % ($p<0.05$) відповідно до показників групи стрес-контролю. Ці результати можуть бути пов'язані з СОД – КАТ- міметичними властивостями НДЦ. Як раніше зазначалося, НДЦ з рівнем окислення (Ce^{3+}), демонструє СОД-міметичну активність, що імітує тим самим каталіз дисмутації супероксидрадикалу аніону в живих клітинах. Наявність іонів з рівнем окислення +4 (Ce^{4+}), на поверхні НДЦ, демонструє КАТ-міметичну активність та здатність до розкладання H_2O_2 на кисень і воду [170], [251].

Отже, аналізуючи вище викладені результати дослідження, можна говорити про значну роль, як меланіну так і нанокристалічного діоксиду церію в захисті слизової оболонки шлунку проти стрес-індукованого ураження. Нами встановлено схожі гастропротекторні механізми підтверджені на моделі імобілізаційного стресу за Сельє, що найбільше відповідає сучасному навантаженню в суспільстві. Отримані нами дані можуть бути використані в фармакології та медицині для створення та реалізації доступних гастропротекторних препаратів, що не проявляють побічних ефектів характерних для більшості сучасних противиразкових препаратів.

ВИСНОВКИ

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

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

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

3. Після трьох годин дії нервово-м'язового напруження за Сельє коефіцієнт маси надниркових зростав, тоді як тимусу зменшувався. За умов профілактичного введення меланіну та НДЦ показники коефіцієнту маси надниркових та тимусу відновлювалися до контрольних значень.

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

5. Досліджувані сполуки проявляли імуномодулюючі властивості за дією на:

- порушену стресом лейкоцитарну формулу крові. Так, при профілактичному введенні меланіну та НДЦ спостерігалось зменшення відсотку паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів відповідно до групи стрес+вода. Вміст лімфоцитів у групі щурів, яким перед нанесенням стресу вводили меланін та НДЦ, відновлювався на 27 % ($p<0,05$) та 58,24% ($p<0,05$) відносно групи стрес+вода;
- стабілізацію рівня про- та антизапальних цитокінів. Введення меланіну та НДЦ зменшувало рівень прозапальних цитокінів інтерлейкіну (ІЛ) – 1β, ІЛ-12β p40 та інтерферону-γ та підвищувало рівень антизапальних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10 та TGF-β в сироватці крові щурів після дії стресу.

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

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

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

[1] J. Xiong *et al.*, “Rebamipide plus proton pump inhibitor versus proton pump inhibitor alone in the treatment of endoscopic submucosal dissection-induced gastric ulcer: a meta-analysis of randomized controlled trials.,” *Medicine (Baltimore).*, vol. 93, no. 12, p. e64, Sep. 2014.

[2] S. El Ouali, A. Barkun, M. Martel, and D. Maggio, “Timing of rebleeding in high-risk peptic ulcer bleeding after successful hemostasis: a systematic review.,” *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 28, no. 10, pp. 543–8, Nov. 2014.

[3] S. K. Doklestić *et al.*, “Secondary peritonitis - evaluation of 204 cases and literature review,” *J. Med. Life*, vol. 7, no. 2, pp. 132–8, 2014.

[4] Н. М. Кізлова, *Медикосоціальнеобгрунтуванняудосконаленнямоделіпрофілактикивиразкової хворобишлункутадванадцятипалоїкишки*. Вінниця, 2017.

[5] Ю. М. Степанов, “Хвороби органів травлення та гастроентерологічна допомога населенню України: здобутки, проблеми та шляхи їх вирішення,” *Гастроентерологія*, no. 3, pp. 10–11, 2014.

[6] М. В. Голубчиков, “Статистичний огляд захворюваності населення України на хвороби органів травлення,” *Сучасна гастроентерол. і гепатол*, no. 1, pp. 17–20, 2000.

[7] Ю. М. Степанов and І. Ю. Скирда, “Гастроентерологічна допомога населенню україни: основні показники здоров’я та ресурсне забезпечення у 2011 р.,” *Гастроентерологія*, vol. 47, no. 1, pp. 8–11, 2013.

[8] L. Melcarne, P. García-Iglesias, and X. Calvet, “Management of NSAID-

associated peptic ulcer disease," *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 6, pp. 723–733, Jun. 2016.

[9] R. H. Hunt *et al.*, "The stomach in health and disease," *Gut*, vol. 64, no. 10, pp. 1650–1668, Oct. 2015.

[10] J. P. Gisbert and X. Calvet, "Review article: the effectiveness of standard triple therapy for Helicobacter pylori has not changed over the last decade, but it is not good enough," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 34, no. 11–12, pp. 1255–1268, Dec. 2011.

[11] M. L. Maes, D. R. Fixen, and S. A. Linnebur, "Adverse effects of proton-pump inhibitor use in older adults: a review of the evidence.," *Ther. Adv. drug Saf.*, vol. 8, no. 9, pp. 273–297, Sep. 2017.

[12] J. H. Kurata and A. N. Nogawa, "Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, Helicobacter pylori, and smoking.," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 1, pp. 2–17, Jan. 1997.

[13] K. Søreide *et al.*, "Perforated peptic ulcer," *Lancet*, vol. 386, no. 10000, pp. 1288–1298, 2015.

[14] A. S. Tarnawski, A. Ahluwalia, and M. K. Jones, "The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 1, pp. 4–15, 2012.

[15] G. Graziani, "Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo," *Gut*, vol. 54, no. 2, pp. 193–200, Feb. 2005.

[16] S. Sumbul, M. A. Ahmad, A. Mohd, and A. Mohd, "Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview.," *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 361–7, 2011.

[17] G. Paturi, C. A. Butts, K. L. Bentley-Hewitt, T. K. McGhie, Z. S. Saleh, and A.

McLeod, “Apple Polyphenol Extracts Protect Against Aspirin-induced Gastric Mucosal Damage in Rats,” *Phyther. Res.*, vol. 28, no. 12, pp. 1846–1854, Dec. 2014.

[18] G. D’Argenio *et al.*, “Apple polyphenol extracts prevent aspirin-induced damage to the rat gastric mucosa.,” *Br. J. Nutr.*, vol. 100, no. 6, pp. 1228–36, Dec. 2008.

[19] , J. Moreno, M. Troncoso, and G. Figueroa, “In Vitro and in Vivo Effects of Apple Peel Polyphenols against Helicobacter pylori,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 12, pp. 7172–7179, Jun. 2010.

[20] S. Sen, K. Asokkumar, M. Umamaheswari, A. T. Sivashanmugam, and V. Subhadradevi, “Antiulcerogenic effect of gallic Acid in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue.,” *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 75, no. 2, pp. 149–55, Mar. 2013.

[21] A. V. Sharma, K. Ganguly, S. Paul, N. Maulik, and S. Swarnakar, “Curcumin Heals Indomethacin-Induced Gastric Ulceration by Stimulation of Angiogenesis and Restitution of Collagen Fibers via VEGF and MMP-2 Mediated Signaling,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no. 4, pp. 351–362, Feb. 2012.

[22] S. Zaghlool, B. Shehata, A. Abo-Seif, and H. Abd El-Latif, “Protective effects of ginger and marshmallow extracts on indomethacin-induced peptic ulcer in rats,” *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, vol. 6, no. 2, p. 421, 2015.

[23] M. d’Ischia *et al.*, “Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications.,” *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 520–44, Sep. 2015.

[24] R. Micillo, L. Panzella, K. Koike, G. Monfrecola, A. Napolitano, and M. D’Ischia, “‘Fifty Shades’ of Black and Red or How Carboxyl Groups Fine Tune Eumelanin and Pheomelanin Properties,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 5, p. 746, May 2016.

[25] Я. М. Савицький, *Автореферат: Вплив меланіну на секреторну функцію шлунку, процеси цитопротекції та моторику проксимального відділу травної системи*. Львів, 2002.

[26] P. Meredith and T. Sarna, “The physical and chemical properties of eumelanin,” *Pigment Cell Res.*, vol. 19, no. 6, pp. 572–594, Dec. 2006.

[27] G. Arun, M. Eyini, and P. Gunasekaran, “Characterization and biological activities of extracellular melanin produced by Schizophyllum commune (Fries).,” *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 53, no. 6, pp. 380–7, Jun. 2015.

[28] C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, and W. T. Self, “Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles,” *Chem. Commun.*, no. 10, p. 1056, 2007.

[29] Y. J. Ji, B. Xiao, Z. H. Wang, M. Z. Cui, and Y. Y. Lu, “The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines.,” *Biomed. Environ. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 287–92, Dec. 2000.

[30] H. Wei and E. Wang, “Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 14, p. 6060, 2013.

[31] О. В. Стефанова, *Доклінічнідослідженнялікарськихзасобів. Методичнірекомендації*. Київ: Авіцена, 2001.

[32] Н. В. Чижанська, *Автореферат: Дослідженнямеханізмівантистрессовоїдіїмеланіну*. Київ, 2008.

[33] J. F. Barletta, J. J. Bruno, M. S. Buckley, and D. J. Cook, “Stress Ulcer Prophylaxis.,” *Crit. Care Med.*, vol. 44, no. 7, pp. 1395–405, Jul. 2016.

[34] F. Alshamsi *et al.*, “Efficacy and safety of proton pump inhibitors for stress ulcer prophylaxis in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials.,” *Crit. Care*, vol. 20, no. 1, p. 120, May 2016.

[35] P. Malfertheiner, A. Kandulski, and M. Venerito, “Proton-pump inhibitors: understanding the complications and risks.,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 12, pp. 697–710, Dec. 2017.

[36] G. Numico, V. Fusco, P. Franco, and F. Roila, “Proton Pump Inhibitors in cancer patients: How useful they are? A review of the most common indications for their use.,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 111, pp. 144–151, Mar. 2017.

[37] M. J. Ben Ali *et al.*, “Investigation of Antiulcer and Antioxidant Activity of Juniperus phoenicea L. (1753) Essential Oil in an Experimental Rat Model.,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 38, no. 11, pp. 1738–46, 2015.

[38] S. B. Almasaudi *et al.*, “Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiulcer Potential of Manuka Honey against Gastric Ulcer in Rats,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, pp. 1–10, 2016.

[39] C. L. F. de Almeida *et al.*, “Spondias purpurea L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2017, pp. 1–14, 2017.

[40] Я. М. Савицький, В. Й. Кімакович, Т. В. Берегова, and М. М. Харченко, “Меланіниврегуляціїмоторноїфункціїпроксимальноговідділутравноготрактутасекреціїшлунковихзалоз,” *Практичнамедицина*, no. 3, pp. 55–59, 2002.

[41] Л. А. Чепелевська, О. М. Дзюба, and Л. А. Карамзіна, “Сучаснiпроблемисмертностінаселенняукраїнивідхвороборганівтравлення,” *Україна. Здоров’янації.*, vol. 33, no. 1, pp. 15–21, 2015.

[42] P. Malfertheiner, F. K. L. Chan, and K. E. L. McColl, “Peptic ulcer disease.,” *Lancet*, vol. 374, no. 9699, pp. 1449–61, 2009.

[43] A. S. Tarnawski, A. Ahluwalia, and M. K. Jones, “The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target.,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 1, pp. 4–15, 2012.

[44] M. Robinson, “Review article: the pharmacodynamics and pharmacokinetics of proton pump inhibitors - overview and clinical implications,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 20, no. s6, pp. 1–10, Nov. 2004.

[45] L. Melcarne, P. García-Iglesias, and X. Calvet, “Management of NSAID-associated peptic ulcer disease,” *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 6, pp. 723–733, Jun. 2016.

[46] M. H. Farzaei, M. Abdollahi, and R. Rahimi, “Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer.,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 21, pp. 6499–6517, 2015.

[47] J. P. Gisbert and X. Calvet, “Review article: the effectiveness of standard triple therapy for Helicobacter pylori has not changed over the last decade, but it is not good enough,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 34, no. 11–12, pp. 1255–1268, Dec. 2011.

[48] S. Levenstein, S. Rosenstock, R. K. Jacobsen, and T. Jorgensen, “Psychological Stress Increases Risk for Peptic Ulcer, Regardless of Helicobacter pylori Infection or Use of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 13, no. 3, p. 498–506.e1, Mar. 2015.

[49] J. H. Kurata and A. N. Nogawa, “Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, Helicobacter pylori, and smoking.,” *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 1, pp. 2–17, Jan. 1997.

[50] T. Kanno *et al.*, “Peptic ulcers after the Great East Japan earthquake and tsunami: possible existence of psychosocial stress ulcers in humans,” *J. Gastroenterol.*, vol. 48, no. 4, pp. 483–490, Apr. 2013.

[51] S. Levenstein *et al.*, “Long-term symptom patterns in duodenal ulcer: psychosocial factors.,” *J. Psychosom. Res.*, vol. 41, no. 5, pp. 465–72, Nov. 1996.

[52] S. Szabo, “Hans Selye and the development of the stress concept. Special

reference to gastroduodenal ulcerogenesis.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 851, pp. 19–27, Jun. 1998.

[53] H. Selye, "A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents," *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, vol. 10, no. 2, p. 230a–231, May 1998.

[54] S. Szabo, "Understanding biologic stress for study design and interpretation of results.," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 30, no. 12 Suppl, p. 28S–31S, Dec. 1985.

[55] H. SELYE, "Stress and the general adaptation syndrome.," *Br. Med. J.*, vol. 1, no. 4667, pp. 1383–92, Jun. 1950.

[56] D. Dragoş and M. D. Tănăsescu, "The effect of stress on the defense systems.," *J. Med. Life*, vol. 3, no. 1, pp. 10–8, 2010.

[57] E. A. MAYER, "The neurobiology of stress and gastrointestinal disease," *Gut*, vol. 47, no. 6, pp. 861–869, Dec. 2000.

[58] A. Slominski, J. Wortsman, T. Luger, R. Paus, and S. Solomon, "Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress.," *Physiol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 979–1020, Jul. 2000.

[59] R. M. Dores and A. J. Baron, "Evolution of POMC: origin, phylogeny, posttranslational processing, and the melanocortins," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1220, no. 1, pp. 34–48, Mar. 2011.

[60] J. R. Revollo and J. A. Cidlowski, "Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1179, no. 1, pp. 167–178, Oct. 2009.

[61] C. M. Schirmer, J. Kornbluth, C. B. Heilman, and A. Bhardwaj, "Gastrointestinal Prophylaxis in Neurocritical Care," *Neurocrit. Care*, vol. 16, no. 1, pp. 184–193, Feb. 2012.

[62] L. Filaretova, "Glucocorticoids are Gastroprotective under Physiologic Conditions.," *Ther. Adv. Chronic Dis.*, vol. 2, no. 5, pp. 333–42, Sep. 2011.

[63] J.-C. Luo *et al.*, “Dexamethasone Inhibits Tumor Necrosis Factor-α-stimulated Gastric Epithelial Cell Migration,” *J. Chinese Med. Assoc.*, vol. 72, no. 10, pp. 509–514, Oct. 2009.

[64] S. Szabo, T. Khomenko, Z. Gombos, X. M. Deng, M. R. Jadus, and M. Yoshida, “Review article: transcription factors and growth factors in ulcer healing,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 14, no. Suppl. 1, pp. 33–43, Feb. 2000.

[65] R. J. Flower, “Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids.,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 94, no. 4, pp. 987–1015, Aug. 1988.

[66] Y. Wang, L. Flores, S. Lu, H. Miao, Y.-S. Li, and S. Chien, “Shear Stress Regulates the Flk-1/Cbl/PI3K/NF-κB Pathway Via Actin and Tyrosine Kinases,” *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 2, no. 3, pp. 341–350, Sep. 2009.

[67] M. Takahashi *et al.*, “Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 98, no. 11, pp. 2604–11, Dec. 1996.

[68] A. S. Tarnawski and A. Ahluwalia, “Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers.,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 1, pp. 16–27, 2012.

[69] J.-C. Luo *et al.*, “Dexamethasone inhibits basic fibroblast growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 76, no. 7, pp. 841–9, 2008.

[70] M. D’Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, “Polyphenols, dietary sources and bioavailability.,” *Ann. Ist. Super. Sanita*, vol. 43, no. 4, pp. 348–61, 2007.

[71] C. Pal *et al.*, “Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis.,” *Free Radic.*

Biol. Med., vol. 49, no. 2, pp. 258–67, Jul. 2010.

[72] F. HALTER, "Cyclooxygenase 2---implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives," *Gut*, vol. 49, no. 3, pp. 443–453, Sep. 2001.

[73] C. Koosirirat, S. Linpisarn, D. Changsom, K. Chawansuntati, and J. Wipasa, "Investigation of the anti-inflammatory effect of Curcuma longa in Helicobacter pylori-infected patients," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 10, no. 7, pp. 815–818, Jul. 2010.

[74] F. Di Mario *et al.*, "A Curcumin-Based 1-Week Triple Therapy for Eradication of Helicobacter pylori Infection: Something to Learn From Failure?," *Helicobacter*, vol. 12, no. 3, pp. 238–243, Jun. 2007.

[75] V. M. Cuevas *et al.*, "Effects of Grape Seed Extract, Vitamin C, and Vitamin E on Ethanol- and Aspirin-Induced Ulcers," *Adv. Pharmacol. Sci.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.

[76] T. Arakawa, "Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance," *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 35, p. 4811, 2012.

[77] Y. Iwasaki, T. Matsui, and Y. Arakawa, "The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats," *J. Gastroenterol.*, vol. 39, no. 9, pp. 831–837, Sep. 2004.

[78] A. Chatterjee, S. Chatterjee, A. Biswas, S. Bhattacharya, S. Chattopadhyay, and S. K. Bandyopadhyay, "Gallic Acid Enriched Fraction of Phyllanthus emblica Potentiates Indomethacin-Induced Gastric Ulcer Healing via e-NOS-Dependent Pathway," *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2012, pp. 1–13, 2012.

[79] G. Carletti, G. Nervo, and L. Cattivelli, "Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 10, no. 10, pp. 1159–

1170, 2014.

[80] B. Winkel-Shirley, “Biosynthesis of flavonoids and effects of stress,” *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. 218–223, Jun. 2002.

[81] T. Løvdal, K. M. Olsen, R. Slimestad, M. Verheul, and C. Lillo, “Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato,” *Phytochemistry*, vol. 71, no. 5–6, pp. 605–613, Apr. 2010.

[82] R. M. Dores and A. J. Baron, “Evolution of POMC: origin, phylogeny, posttranslational processing, and the melanocortins,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1220, pp. 34–48, 2011.

[83] S. E. Wendelaar Bonga, “The stress response in fish.,” *Physiol. Rev.*, vol. 77, no. 3, pp. 591–625, Jul. 1997.

[84] G. Prota, “The chemistry of melanins and melanogenesis.,” *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, vol. 64, pp. 93–148, 1995.

[85] J. Li, H. Lu, J. Liu, H. Hong, and C. Yan, “The influence of flavonoid amendment on the absorption of cadmium in Avicennia marina roots,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 120, pp. 1–6, Oct. 2015.

[86] Y.-J. Kim and H. Uyama, “Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 15, pp. 1707–1723, Aug. 2005.

[87] F. Solano, “Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes,” *New J. Sci.*, vol. 2014, pp. 1–28, 2014.

[88] R. A. Wogelius *et al.*, “Trace Metals as Biomarkers for Eumelanin Pigment in the Fossil Record,” *Science (80-.).*, vol. 333, no. 6049, pp. 1622–1626, Sep. 2011.

[89] F. Zhang *et al.*, “Fossilized melanosomes and the colour of Cretaceous dinosaurs and birds,” *Nature*, vol. 463, no. 7284, pp. 1075–1078, Feb. 2010.

[90] Y. Yamaguchi, M. Brenner, and V. J. Hearing, “The Regulation of Skin Pigmentation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 38, pp. 27557–27561, Sep. 2007.

[91] A. Chakraborty, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, and J. Pawelek, “Ultraviolet B and Melanocyte-Stimulating Hormone (MSH) Stimulate mRNA Production for ∝MSH Receptors and Proopiomelanocortin-Derived Peptides in Mouse Melanoma Cells and Transformed Keratinocytes,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 105, no. 5, pp. 655–659, Nov. 1995.

[92] W. D. Bush *et al.*, “The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 40, pp. 14785–14789, Oct. 2006.

[93] Y. Cheli *et al.*, “MSH and Cyclic AMP Elevating Agents Control Melanosome pH through a Protein Kinase A-independent Mechanism,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 28, pp. 18699–18706, Jul. 2009.

[94] G. SZABÓ, A. B. GERALD, M. A. PATHAK, and T. B. FITZPATRICK, “Racial Differences in the Fate of Melanosomes in Human Epidermis,” *Nature*, vol. 222, no. 5198, pp. 1081–1082, Jun. 1969.

[95] J. D. Simon, L. Hong, and D. N. Peles, “Insights into Melanosomes and Melanin from Some Interesting Spatial and Temporal Properties †,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, no. 42, pp. 13201–13217, Oct. 2008.

[96] L. Hong and J. D. Simon, “Current Understanding of the Binding Sites, Capacity, Affinity, and Biological Significance of Metals in Melanin,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 28, pp. 7938–7947, Jul. 2007.

[97] T. CARO, “The Adaptive Significance of Coloration in Mammals,” *Bioscience*, vol. 55, no. 2, p. 125, 2005.

[98] M. Ye, X. Chen, G. W. Li, G. Y. Guo, and L. Yang, "Structural Characteristics of Pheomelanin-Like Pigment from Lachnum singerianum," *Adv. Mater. Res.*, vol. 284–286, pp. 1742–1745, Jul. 2011.

[99] A. Roulin, A. Mafli, and K. Wakamatsu, "Reptiles Produce Pheomelanin: Evidence in the Eastern Hermann's Tortoise (Eurotestudo boettgeri)," *J. Herpetol.*, vol. 47, no. 2, pp. 258–261, Jun. 2013.

[100] U. Schraermeyer and K. Heimann, "Current Understanding on the Role of Retinal Pigment Epithelium and its Pigmentation," *Pigment Cell Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 219–236, Aug. 1999.

[101] A. Meyer zum Gottesberge-Orsulakova, "Melanin in the inner ear: micromorphological and microanalytical investigations.," *Acta Histochem. Suppl.*, vol. 32, pp. 245–53, 1986.

[102] D. G. Graham, "On the origin and significance of neuromelanin.," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 103, no. 7, pp. 359–62, Jul. 1979.

[103] H. FEDOROW, F. TRIBL, G. HALLIDAY, M. GERLACH, P. RIEDERER, and K. DOUBLE, "Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease," *Prog. Neurobiol.*, vol. 75, no. 2, pp. 109–124, Feb. 2005.

[104] M. Randhawa *et al.*, "Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue," *FASEB J.*, vol. 23, no. 3, pp. 835–843, Mar. 2009.

[105] H. C. Eisenman and A. Casadevall, "Synthesis and assembly of fungal melanin," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 3, pp. 931–940, Feb. 2012.

[106] R. de C. R. Gonçalves, R. R. Kitagawa, M. S. G. Raddi, I. Z. Carlos, and S. R. Pombeiro-Sponchiado, "Inhibition of nitric oxide and tumour necrosis factor-α production in peritoneal macrophages by Aspergillus nidulans melanin.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 36, no. 12, pp. 1915–20, 2013.

[107] E. Sansinenea and A. Ortiz, “Melanin: a photoprotection for Bacillus thuringiensis based biopesticides.,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, no. 3, pp. 483–90, Mar. 2015.

[108] M. T. Cubo, A. M. Buendia-Claveria, J. E. Beringer, and J. E. Ruiz-Sainz, “Melanin production by Rhizobium strains.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, no. 7, pp. 1812–7, Jul. 1988.

[109] “ChemSpider Search and share chemistry: Melanin structure.” [Online]. Available: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4884931.html?rid=9b16a7cc-92a9-400a-b59b-d9de49b47c51.

[110] S. Ito and K. Wakamatsu, “Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review.,” *Pigment cell Res.*, vol. 16, no. 5, pp. 523–31, Oct. 2003.

[111] N. M. Permyakova, T. B. Zheltonozhskaya, T. V. Beregova, D. O. Klymchuk, T. M. Falalyeyeva, and L. N. Grishchenko, “Micellar nanocarriers for anticancer drug melanin,” *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 640, no. 1, pp. 122–133, Nov. 2016.

[112] É. Hideg, M. A. K. Jansen, and Å. Strid, “UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates?,” *Trends Plant Sci.*, vol. 18, no. 2, pp. 107–115, Feb. 2013.

[113] S. G. Coelho *et al.*, “Short- and Long-Term Effects of UV Radiation on the Pigmentation of Human Skin,” *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, vol. 14, no. 1, pp. 32–35, Aug. 2009.

[114] M. Kobayashi, N. Aita, S. Hayashi, K. Okada, T. Ohta, and S. Hirose, “DNA supercoiling factor localizes to puffs on polytene chromosomes in Drosophila melanogaster.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 6737–44, Nov. 1998.

[115] J. J. Riesz, J. B. Gilmore, R. H. McKenzie, B. J. Powell, M. R. Pederson, and P. Meredith, “Transition dipole strength of eumelanin.,” *Phys. Rev. E. Stat.*

Nonlin. Soft Matter Phys., vol. 76, no. 2 Pt 1, p. 21915, Aug. 2007.

[116] S. M. Ostojic, "Eumelanin-driven production of molecular hydrogen: A novel element of skin defense?," *Med. Hypotheses*, vol. 85, no. 2, pp. 237–238, Aug. 2015.

[117] S. Jiang *et al.*, "Regulation of DHICA-mediated antioxidation by dopachrome tautomerase: Implication for skin photoprotection against UVA radiation," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 9, pp. 1144–1151, May 2010.

[118] F. A. Zucca *et al.*, "Neuromelanin of the Human Substantia Nigra: An Update," *Neurotox. Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 13–23, Jan. 2014.

[119] I. GALVÁN and A. P. MØLLER, "Brain size and the expression of pheomelanin-based colour in birds," *J. Evol. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 999–1006, May 2011.

[120] P. Malfertheiner and M. Selgrad, "Helicobacter pylori," *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 30, no. 6, pp. 589–595, Nov. 2014.

[121] S. Tian, J. Garcia-Rivera, B. Yan, A. Casadevall, and R. E. Stark, "Unlocking the Molecular Structure of Fungal Melanin Using 13 C Biosynthetic Labeling and Solid-State NMR †," *Biochemistry*, vol. 42, no. 27, pp. 8105–8109, Jul. 2003.

[122] M. Sugimoto *et al.*, "Efficacy of Tailored Helicobacter pylori Eradication Treatment Based on Clarithromycin Susceptibility and Maintenance of Acid Secretion," *Helicobacter*, vol. 19, no. 4, pp. 312–318, Aug. 2014.

[123] R. M. Dores, L. Liang, P. Davis, A. L. Thomas, and B. Petko, "60 YEARS OF POMC: Melanocortin receptors: evolution of ligand selectivity for melanocortin peptides," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 56, no. 4, pp. T119–T133, May 2016.

[124] M. H. Park *et al.*, "The Novel PPAR α/γ Dual Agonist MHY 966 Modulates UVB–Induced Skin Inflammation by Inhibiting NF-κB Activity," *PLoS One*,

vol. 8, no. 10, p. e76820, Oct. 2013.

[125] L. Laine, K. Takeuchi, and A. Tarnawski, “Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside,” *Gastroenterology*, vol. 135, no. 1, pp. 41–60, Jul. 2008.

[126] Н. В. Чижанська, В. М. Кухарський, О. І. Цирюк, and Т. В. Берегова, “Впливмеланінунаекспресіюепітеліальноїізоформисинтазиоксидуазоту (ENOS) вслизовійоболонцішлункущурів,” *Проблемиекологічноїтамедичноїгенетикиіклінічноїімунології*, no. 5, pp. 52–59, 2005.

[127] M. Jastrzebska, I. Mróz, B. Barwiński, R. Wrzalik, and S. Boryczka, “AFM investigations of self-assembled DOPA–melanin nano-aggregates,” *J. Mater. Sci.*, vol. 45, no. 19, pp. 5302–5308, Oct. 2010.

[128] A. A. R. Watt, J. P. Bothma, and P. Meredith, “The supramolecular structure of melanin,” *Soft Matter*, vol. 5, no. 19, p. 3754, 2009.

[129] L. Panzella *et al.*, “Atypical Structural and π-Electron Features of a Melanin Polymer That Lead to Superior Free-Radical-Scavenging Properties,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 52, no. 48, pp. 12684–12687, Nov. 2013.

[130] M. G. Bridelli, A. Ciati, and P. R. Crippa, “Binding of chemicals to melanins re-examined: Adsorption of some drugs to the surface of melanin particles,” *Biophys. Chem.*, vol. 119, no. 2, pp. 137–145, Jan. 2006.

[131] D. R. Dreyer, D. J. Miller, B. D. Freeman, D. R. Paul, and C. W. Bielawski, “Elucidating the Structure of Poly(dopamine),” *Langmuir*, vol. 28, no. 15, pp. 6428–6435, Apr. 2012.

[132] L. Tang, J. Li, X. Lin, W. Wu, K. Kang, and W. Fu, “Oxidation Levels Differentially Impact Melanocytes: Low versus High Concentration of Hydrogen Peroxide Promotes Melanin Synthesis and Melanosome Transfer,” *Dermatology*, vol. 224, no. 2, pp. 145–153, 2012.

[133] Y. Liu, K. Ai, and L. Lu, “Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields,” *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 9, pp. 5057–5115, May 2014.

[134] A. A.M. Adly, “Oxidative Stress and Disease: An Updated Review,” *Res. J. Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 129–145, Feb. 2010.

[135] A. D. Schweitzer *et al.*, “Melanin-Covered Nanoparticles for Protection of Bone Marrow During Radiation Therapy of Cancer,” *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 78, no. 5, pp. 1494–1502, Dec. 2010.

[136] M. Araújo *et al.*, “Natural melanin: A potential pH-responsive drug release device,” *Int. J. Pharm.*, vol. 469, no. 1, pp. 140–145, Jul. 2014.

[137] M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon, and R. J. Levy, “Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size.,” *Pharm. Res.*, vol. 13, no. 12, pp. 1838–45, Dec. 1996.

[138] J. A. Champion, Y. K. Katare, and S. Mitragotri, “Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers,” *J. Control. Release*, vol. 121, no. 1–2, pp. 3–9, Aug. 2007.

[139] S. Muro *et al.*, “Control of Endothelial Targeting and Intracellular Delivery of Therapeutic Enzymes by Modulating the Size and Shape of ICAM-1-targeted Carriers,” *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 8, pp. 1450–1458, Aug. 2008.

[140] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, and M. Ferrari, “Intravascular delivery of particulate systems: Does geometry really matter?,” *Pharmaceutical Research*, vol. 26, no. 1. pp. 235–243, 2009.

[141] H. Wei and E. Wang, “Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 14, p. 6060, 2013.

[142] J. Dahle and Y. Arai, “Environmental Geochemistry of Cerium: Applications

and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 12, no. 2, pp. 1253–1278, Jan. 2015.

[143] M. You, K. Li, Y. Xie, L. Huang, and X. Zheng, "The Effects of Cerium Valence States at Cerium Oxide Coatings on the Responses of Bone Mesenchymal Stem Cells and Macrophages," *Biol. Trace Elem. Res.*, Feb. 2017.

[144] R. Cuahtecontzi-Delint, M. A. Mendez-Rojas, E. R. Bandala, M. A. Quiroz, S. Recillas, and J. L. Sanchez-Salas, "Enhanced Antibacterial Activity of CeO2 Nanoparticles by Surfactants," *Int. J. Chem. React. Eng.*, vol. 11, no. 2, Jan. 2013.

[145] S. A. Kuddus, "Nanoceria and Its Perspective in Cancer Treatment," *J. Cancer Sci. Ther.*, vol. 9, no. 3, pp. 368–373, 2017.

[146] K. Reed *et al.*, "Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom?," *Environ. Sci. Nano*, vol. 1, no. 5, pp. 390–405, 2014.

[147] V. K. Ivanov, A. B. Shcherbakov, and A. V Usatenko, "Structure-sensitive properties and biomedical applications of nanodispersed cerium dioxide," *Russ. Chem. Rev.*, vol. 78, no. 9, pp. 855–871, Sep. 2009.

[148] H. Jung, D. B. Kittelson, and M. R. Zachariah, "The influence of a cerium additive on ultrafine diesel particle emissions and kinetics of oxidation," *Combust. Flame*, vol. 142, no. 3, pp. 276–288, Aug. 2005.

[149] C. Walkey *et al.*, "Catalytic Properties and Biomedical Applications of Cerium Oxide Nanoparticles.," *Environ. Sci. Nano*, vol. 2, no. 1, pp. 33–53, Feb. 2015.

[150] S. Deshpande, S. Patil, S. V. Kuchibhatla, and S. Seal, "Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 87, no. 13, p. 133113, Sep. 2005.

[151] C. Korsvik, S. Patil, S. Seal, and W. T. Self, “Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles,” *Chem. Commun.*, no. 10, p. 1056, 2007.

[152] S. Das, J. M. Dowding, K. E. Klump, J. F. McGinnis, W. Self, and S. Seal, “Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine,” *Nanomedicine*, vol. 8, no. 9, pp. 1483–1508, Sep. 2013.

[153] S. Tsunekawa, R. Sivamohan, T. Ohsuna, H. Takahashi, and K. Tohji, “Ultraviolet Absorption Spectra of CeO2 Nano-Particles,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 315–317, pp. 439–445, 1999.

[154] S. Tsunekawa, R. Sivamohan, S. Ito, A. Kasuya, and T. Fukuda, “Structural study on monosize CeO2-x nano-particles,” *Nanostructured Mater.*, vol. 11, no. 1, pp. 141–147, Feb. 1999.

[155] A. Nel, “Toxic Potential of Materials at the Nanolevel,” *Science (80-.).*, vol. 311, no. 5761, pp. 622–627, Feb. 2006.

[156] А. Б. Щербаков, О. С. Иванова, Н. Я. Спивак, В. В. Козик, and В. К. Иванов, *Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия*. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2016.

[157] А. Б. Щербаков, В. К. Иванов, Н. М. Жолобак, О. С. Иванова, and Н. Я. Спивак, “Нанокристаллический диоксид церия – перспективный материал для биомедицинского применения,” *Биофизика*, vol. 56, no. 6, pp. 995–1015, 2011.

[158] A. Ramesh, R. Narasimha Naik Ratla, and I. Rajitha, “Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Assessment of the,” *Int. J. Phytopharm.*, vol. 5, no. 1, pp. 46–50, 2014.

[159] A. García *et al.*, “Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests,” *Desalination*, vol. 269, no. 1–3, pp.

136–141, Mar. 2011.

[160] Т. О. Шекунова, Д. О. Гиль, О. С. Иванова, В. К. Иванов, and Ю. . Третьяков, “Синтез, биологическая и фотокаталитическая активность золей диоксида церия, стабилизированных цитрат-ионом,” *Наносистемы: Физика, Химия, Математика*, vol. 4, no. 1, pp. 83–89, 2013.

[161] W. H. Suh, K. S. Suslick, G. D. Stucky, and Y.-H. Suh, “Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience.,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 87, no. 3, pp. 133–70, Feb. 2009.

[162] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, and J. M. Perez, “Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 9, pp. 5321–5331, Sep. 2010.

[163] T. Xia *et al.*, “Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties.,” *ACS Nano*, vol. 2, no. 10, pp. 2121–34, Oct. 2008.

[164] S. M. Hirst *et al.*, “Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice,” *Environ. Toxicol.*, vol. 28, no. 2, pp. 107–118, Feb. 2013.

[165] B. Sturbaum, A. L. Brooks, and R. O. McClellan, “Tissue distribution and dosimetry of 144Ce in Chinese hamsters.,” *Radiat. Res.*, vol. 44, no. 2, pp. 359–67, Nov. 1970.

[166] C. R. Richmond and J. E. London, “Long-term in vivo retention of cerium-144 by beagles.,” *Nature*, vol. 211, no. 5054, p. 1179, Sep. 1966.

[167] G.-J. Beyer *et al.*, “Comparative kinetic studies of simultaneously injected 167Tm- and 67Ga-Citrate in Normal and Tumour bearing mice,” *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, vol. 29, no. 11, pp. 673–681, Nov. 1978.

[168] C. Portioli *et al.*, “Short-Term Biodistribution of Cerium Oxide Nanoparticles

in Mice: Focus on Brain Parenchyma," *Nanosci. Nanotechnol. Lett.*, vol. 5, no. 11, pp. 1174–1181, Nov. 2013.

[169] G. Bresciani, I. B. M. da Cruz, and J. González-Gallego, "Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation," in *Advances in Clinical Chemistry*, 2015, pp. 87–130.

[170] E. G. Heckert, A. S. Karakoti, S. Seal, and W. T. Self, "The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria," *Biomaterials*, vol. 29, no. 18, pp. 2705–2709, Jun. 2008.

[171] L. Góth and T. Nagy, "Inherited catalase deficiency: is it benign or a factor in various age related disorders?," *Mutat. Res.*, vol. 753, no. 2, pp. 147–54.

[172] B. A. Rzigalinski, K. Meehan, R. M. Davis, Y. Xu, W. C. Miles, and C. A. Cohen, "Radical nanomedicine," *Nanomedicine*, vol. 1, no. 4, pp. 399–412, Dec. 2006.

[173] J. M. Dowding *et al.*, "Cellular Interaction and Toxicity Depend on Physicochemical Properties and Surface Modification of Redox-Active Nanomaterials," *ACS Nano*, vol. 7, no. 6, pp. 4855–4868, Jun. 2013.

[174] S. M. H. J. Scholten-Jaegers, M. K. Nieuwenhuis, M. E. van Baar, A. S. Niemeijer, J. Hiddingh, and G. I. J. M. Beerthuizen, "Epidemiology and Outcome of Patients With Burns Treated With Cerium Nitrate Silversulfadiazine," *J. Burn Care Res.*, vol. 38, no. 1, pp. e432–e442, 2017.

[175] J. M. Sobek and D. E. Talburt, "Effects of the rare earth cerium on Escherichia coli.," *J. Bacteriol.*, vol. 95, no. 1, pp. 47–51, Jan. 1968.

[176] Н. М. Жолобак, "К вопросу о механизме антибактериального и пробиотического действия коллоидного (наноразмерного) диоксида церия," *Вісник проблем біології і медицини*, vol. 1, no. 2, pp. 9–15, 2016.

[177] O. Zeyons *et al.*, "Direct and indirect CeO 2 nanoparticles toxicity for

Escherichia coli and Synechocystis," *Nanotoxicology*, vol. 3, no. 4, pp. 284–295, Dec. 2009.

[178] L. E. Wroblewski, R. M. Peek, and K. T. Wilson, "Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 4, pp. 713–739, Oct. 2010.

[179] R. H. Hunt *et al.*, "The stomach in health and disease," *Gut*, vol. 64, no. 10, pp. 1650–1668, Oct. 2015.

[180] D. Golyshkin *et al.*, "Nanocrystalline cerium dioxide efficacy for prophylaxis of erosive and ulcerative lesions in the gastric mucosa of rats induced by stress," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 84, pp. 1383–1392, Dec. 2016.

[181] J. S. Ma *et al.*, "Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-?B and IFN-?/STAT1 pathways in RAW264.7 cells," *Nitric Oxide*, vol. 23, no. 3, pp. 214–219, Nov. 2010.

[182] S. M. Hirst, A. S. Karakoti, R. D. Tyler, N. Sriranganathan, S. Seal, and C. M. Reilly, "Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles," *Small*, vol. 5, no. 24, pp. 2848–2856, Dec. 2009.

[183] Z. Serebrovska *et al.*, "Anti-inflammatory and antioxidant effect of cerium dioxide nanoparticles immobilized on the surface of silica nanoparticles in rat experimental pneumonia.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 92, pp. 69–77, Aug. 2017.

[184] О. Ю. Єфіменко, Ю. О. Савченко, Т. М. Фалалєєва, and Т. В. Берегова, "Змінимоторноїфункціїшлункутатовстоїкишкиущурівпідвпливомнанокристалічногодіоксидуцерію," *Фізіологічнийжурнал*, vol. 60, no. 3, pp. 67–74, 2014.

[185] В. И. Мальцев and Д. Ю. Белоусов, "Этическая оценка методик проведения исследований," *Еженедельник Аптека*, vol. 34, p. 35, 2001.

[186] “Наказ МОЗ України № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів» від 14.12.2009,” pp. 1–22.

[187] В. В. Меньшиков, *Лабораторные методы исследования в клинике*. М.: Медицина, 1987.

[188] С. С. Тетянець, “Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови,” *Лаб. дело.*, no. 1, pp. 61–62, 1985.

[189] П. Н. Шараев, Н. С. Стрелков, and Р. Р. Кильдиярова, “Метод определения фукозы, не связанной с белками,” *Клин. лаб. диагностика*, no. 4, pp. 17–18, 1997.

[190] П. Н. Шараев, “Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях,” *Лаб. дело.*, no. 5, pp. 530–532, 1987.

[191] О. Е. Колесова, А. А. Маркин, and Т. Н. Федорова, “Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах,” *Лабораторное дело*, no. 9, pp. 540–546, 1984.

[192] В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, and Н. Ф. Хмара, “Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов,” *Лабораторное дело*, no. 2, pp. 60–63, 1988.

[193] В. Н. Орехович, *Современные методы в биохимии*. М.: Медицина, 1977.

[194] C. A. Gay and J. M. Gebicki, “Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric-xylenol orange method.,” *Anal. Biochem.*, vol. 315, no. 1, pp. 29–35, Apr. 2003.

[195] С. Чевари, И. Чаба, and Й. Секей, “Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах,” *Лабораторное дело*, no. 11, pp. 678 – 681, 1985.

[196] М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, and В. Е. Токарев, “Метод определения активности каталазы,” no. 1, pp. 16–18, 1988.

[197] А. Я. Любина and Л. П. Ильичева, *Клинические лабораторные исследования*. М.: Медицина, 1984.

[198] С. Л. Кузнецов and Н. Н. Мушкамбаров, *Гистология, цитология и эмбриология: Учебник для медицинских вузов.* М.: ООО «Медицинскоеинформационноеагентство», 2007.

[199] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Wescott, "Methods for the formation of single bimolecular membranes in aqueous solution," *Nature*, vol. 194, pp. 976–983, 1962.

[200] J. R. Crowther, *The ELISA Guidebook. Second Edition*. Vienna: Humana Press, 2009.

[201] Ю. О. Реброва, *Статистический анализ медицинских данных*. М.: МедиаСфера, 2002.

[202] O. P. Malley, "Gastric ulcers and GERD: The new plagues of the 21st century update for the clinical nurse specialist," *Clin. Nurse. Spec.*, vol. 17, pp. 286–289, 2003.

[203] W. A. Hoogerwerf and P. J. Pasricha, *Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease. Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York: Mc Graw-Hill, 2001.

[204] D. L. Valle, *Peptic ulcer diseases and related disorders. Harrison's principles of internal medicine.* New York: McGraw-Hill, 2005.

[205] P. Dharmani, P. K. Mishra, R. Maurya, V. Singh Chauhan, and G. Palit, "Allophylus serratus: a plant with potential anti-ulcerogenic activity.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 99, no. 3, pp. 361–6, Jul. 2005.

[206] D. M. McCarthy, "Adverse effects of proton pump inhibitor drugs: clues and conclusions.," *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 26, no. 6, pp. 624–631, 2010.

[207] K. Iijima, “Helicobacter pylori-negative, non-steroidal anti-inflammatory drug: Negative idiopathic ulcers in Asia,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 3, p. 706, 2014.

[208] K. Iijima, T. Koike, Y. Abe, S. Ohara, N. Nakaya, and T. Shimosegawa, “Time series analysis of gastric acid secretion over a 20-year period in normal Japanese men,” *J. Gastroenterol.*, vol. 50, no. 8, pp. 853–861, Aug. 2015.

[209] G. L.-H. Wong *et al.*, “High incidence of mortality and recurrent bleeding in patients with Helicobacter pylori-negative idiopathic bleeding ulcers.,” *Gastroenterology*, vol. 137, no. 2, pp. 525–31, Aug. 2009.

[210] M. J. Spirt and S. Stanley, “Update on stress ulcer prophylaxis in critically ill patients.,” *Crit. Care Nurse*, vol. 26, no. 1, p. 18–20, 22–8; quiz 29, Feb. 2006.

[211] J. T. Lima *et al.*, “Spasmolytic action of diplotropin, a furanoflavan from Diplotropis ferruginea Benth., involves calcium blockade in guinea-pig ileum,” *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.*, vol. 60, no. 10, pp. 1093–1100, 2005.

[212] G. Di Carlo *et al.*, “Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships.,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 45, no. 12, pp. 1054–9, Dec. 1993.

[213] M. J. Martín, C. La-Casa, C. Alarcón-de-la-Lastra, J. Cabeza, I. Villegas, and V. Motilva, “Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin.,” *r Naturforschung. C, J. Biosci.*, vol. 53, no. 1–2, pp. 82–8, Jan. .

[214] n Calero, “Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 71, no. 1–2, pp. 45–53, 2000.

[215] C. Alarcón de la Lastra, M. J. Martín, C. La Casa, and V. Motilva,

"Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from Bidens aurea: comparison with ranitidine and omeprazole.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 42, no. 3, pp. 161–8, May 1994.

[216] Н. В. Чижанська, О. І. Цирюк, and Т. В. Берегова, "Рівенькортизолувкровіщурівдотапіслястресунафонідіїмеланіну," *Вісникпроблембіологіїімедицини*, no. 1, pp. 40–43, 2001.

[217] A.-L. Ducrest, L. Keller, and A. Roulin, "Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes.," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 23, no. 9, pp. 502–10, Sep. 2008.

[218] Y. Savytskyy, D. Golyshkin, and T. Falalyeyeva, "Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuromuscular tension according to Selye," *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, Sect. DDD Pharm.*, vol. 23, no. 2, pp. 243–246, 2010.

[219] E. G. Barrett, C. Johnston, G. Oberdörster, and J. N. Finkelstein, "Antioxidant treatment attenuates cytokine and chemokine levels in murine macrophages following silica exposure.," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 158, no. 3, pp. 211–20, 1999.

[220] R. Sapolsky, C. Rivier, G. Yamamoto, P. Plotsky, and W. Vale, "Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor.," *Science*, vol. 238, no. 4826, pp. 522–524, 1987.

[221] J. B. DEKANSKI, A. MACDONALD, P. SACRA, and D. V. PARKE, "EFFECTS OF FASTING, STRESS AND DRUGS ON GASTRIC GLYCOPROTEIN SYNTHESIS IN THE RAT," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 55, no. 3, pp. 387–392, Nov. 1975.

[222] R. Prasad, R. Davan, S. Jothi, A. R. Phani, and D. B. Raju, "Cerium Oxide Nanoparticles Protects Gastrointestinal Mucosa From Ethanol Induced Gastric Ulcers in In-Vivo Animal Model," *Nano Biomed. Eng.*, vol. 5, no. 1, Mar. 2013.

[223] L. Liu, “Oxidative stress induces gastric submucosal arteriolar dysfunction in the elderly,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 19, no. 48, p. 9439, 2013.

[224] B. Nelson, M. Johnson, M. Walker, K. Riley, and C. Sims, “Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine,” *Antioxidants*, vol. 5, no. 2, pp. 1–21, May 2016.

[225] I. Celardo, J. Z. Pedersen, E. Traversa, and L. Ghibelli, “Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles,” *Nanoscale*, vol. 3, no. 4, p. 1411, 2011.

[226] J. Colon *et al.*, “Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 5, pp. 698–705, Oct. 2010.

[227] Y. Taché, V. Martinez, M. Million, and L. Wang, “Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors.,” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 280, no. 2, pp. G173-7, Feb. 2001.

[228] L. I. Pearlin, S. Schieman, E. M. Fazio, and S. C. Meersman, “Stress, Health, and the Life Course: Some Conceptual Perspectives,” *J. Health Soc. Behav.*, vol. 46, no. 2, pp. 205–219, Jun. 2005.

[229] A. Franchini and E. Ottaviani, “Thymus: Conservation in evolution,” *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 246, pp. 46–50, 2017.

[230] E. Ottaviani, A. Franchini, and C. Franceschi, “Evolution of neuroendocrine thymus: studies on POMC-derived peptides, cytokines and apoptosis in lower and higher vertebrates.,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 72, no. 1, pp. 67–74, Jan. 1997.

[231] A. Cossarizza *et al.*, “Mitochondrial Modifications during Rat Thymocyte Apoptosis: A Study at the Single Cell Level,” *Exp. Cell Res.*, vol. 214, no. 1, pp. 323–330, Sep. 1994.

[232] A. Cossarizza *et al.*, “Mitochondrial Modifications during Rat Thymocyte Apoptosis: A Study at the Single Cell Level,” *Exp. Cell Res.*, vol. 214, no. 1, pp. 323–330, Sep. 1994.

[233] J. M. Reinke and H. Sorg, “Wound repair and regeneration,” *Eur. Surg. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 35–43, 2012.

[234] I. M. Skrypnyk, “[Biochemical mechanism of ulcer development under stressful conditions].,” *Ukr. Biokhim. Zh.*, vol. 73, no. 1, pp. 110–4, 1999.

[235] T. Hasebe, “Collagen and collagenase in ulcer tissue--2. Restraint and water immersion induced gastric lesions and effects of cimetidine and misoprostol.,” *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 181–90, Sep. 1987.

[236] T. Arisawa *et al.*, “Effects of sucralfate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxyproline content in healing of ethanol-hcl-induced gastric lesions,” *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 33, no. 7, pp. 628–632, 2006.

[237] D. J. Becker and J. B. Lowe, “Fucose: biosynthesis and biological function in mammals.,” *Glycobiology*, vol. 13, no. 7, p. 41R–53R, 2003.

[238] L. E. Tracy, R. A. Minasian, and E. J. Caterson, “Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound,” *Adv. Wound Care*, vol. 5, no. 3, pp. 119–136, Mar. 2016.

[239] S. Chigurupati *et al.*, “Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 9, pp. 2194–2201, Mar. 2013.

[240] S. Kwiecien *et al.*, “Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury.,” *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 5, pp. 613–22, Oct. 2014.

[241] D. Vučević *et al.*, “Influence of aging on ethanol-induced oxidative stress in

digestive tract of rats," *Hum. Exp. Toxicol.*, vol. 32, no. 7, pp. 698–705, Jul. 2013.

[242] A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay, S. Mitra, and S. E. Crowe, "Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases.," *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 2, pp. 329–54, Apr. 2014.

[243] K. Kasazaki, K. Yasukawa, H. Sano, and H. Utsumi, "Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH4OH-induced gastric lesions of rats using a 300 MHz in vivo ESR technique.," *Free Radic. Res.*, vol. 37, no. 7, pp. 757–66, Jul. 2003.

[244] T. Matsuda *et al.*, "Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa.," *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 1, pp. 121–7, Jan. 2013.

[245] T. Matsuda *et al.*, "Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa.," *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 1, pp. 121–7, Jan. 2013.

[246] M. M. Gaschler and B. R. Stockwell, "Lipid peroxidation in cell death.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 482, no. 3, pp. 419–425, 2017.

[247] B. Tudek, D. Zdżalik-Bielecka, A. Tudek, K. Kosicki, A. Fabisiewicz, and E. Speina, "Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 107, pp. 77–89, Jun. 2017.

[248] K. Li, Y. Xie, M. You, L. Huang, and X. Zheng, "Plasma sprayed cerium oxide coating inhibits H2O2-induced oxidative stress and supports cell viability," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 6, p. 100, Jun. 2016.

[249] S. C. Bölükbaşı, A. A. Al-sagan, H. Ürüşan, M. K. Erhan, O. Durmuş, and N. Kurt, "Effects of cerium oxide supplementation to laying hen diets on performance, egg quality, some antioxidant enzymes in serum and lipid oxidation in egg yolk," *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).*, vol. 100, no. 4, pp. 686–693, Aug. 2016.

[250] D. Ali, S. Alarifi, S. Alkahtani, A. A. AlKahtane, and A. Almalik, “Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 71, no. 3, pp. 1643–1651, Apr. 2015.

[251] K. Li, Y. Xie, M. You, L. Huang, and X. Zheng, “Plasma sprayed cerium oxide coating inhibits H2O2-induced oxidative stress and supports cell viability,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 27, no. 6, p. 100, Jun. 2016.

[252] N. Kobyliak *et al.*, “Prevention of NAFLD development in rats with obesity via the improvement of pro/antioxidant state by cerium dioxide nanoparticles,” *Clujul Med.*, vol. 89, no. 2, p. 229, Apr. 2016.

[253] M. Kozakowska, K. Pietraszek-Gremplewicz, A. Jozkowicz, and J. Dulak, “The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes,” *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 36, no. 6, pp. 377–393, Dec. 2015.

[254] M. Kozakowska, K. Pietraszek-Gremplewicz, A. Jozkowicz, and J. Dulak, “The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes,” *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 36, no. 6, pp. 377–393, Dec. 2015.

[255] S. Salim, “Oxidative stress: a potential link between emotional wellbeing and immune response,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 29, pp. 70–76, Aug. 2016.

[256] S. K. Yadav, B. Adhikary, S. K. Bandyopadhyay, and S. Chattopadhyay, “Inhibition of TNF-α, and NF-κB and JNK pathways accounts for the prophylactic action of the natural phenolic, allylpyrocatechol against indomethacin gastropathy,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 6, pp. 3776–3786, Jun. 2013.

[257] М. З. Федорова and В. Н. Левин, “Методкомплексногоисследованиягеометрии, площадиповерхности,

резервныхвозможностеймембраныиосморегуляциилейкоцитовкрови,” *Клин. лаб. диагностика*., no. 11, pp. 44–46, 1997.

[258] І. В. Гомоляко and К. П. Тумасова, “Ультраструктурна характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові у хворих на хронічний холецистит,” *Вісник морфології*, no. 5, pp. 6–8, 1999.

[259] Ж. Г. Мустафина, Ю. С. Краморенко, and В. Ю. Кобцева, “Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией,” *Клин. лаб. диагностика*, no. 5, pp. 47–49, 1999.

[260] І. Бродяк and Н. Сибірна, “Морфофункціональні дослідження лейкоцитів периферійної крові за умов експериментального цукрового діабету у щурів,” *Вісник Львівського університету. Серіябіологічна*., vol. 42, pp. 117–127, 2006.

[261] M. Krag, A. Perner, J. Wetterslev, M. P. Wise, and M. H. Møller, “Trials on stress ulcer prophylaxis: finding the balance between benefit and harm.,” *Intensive Care Med.*, vol. 41, no. 7, pp. 1367–8, Jul. 2015.

[262] K. Nakamura, “[Central Circuit Mechanism for Psychological Stress-Induced Hyperthermia].,” *no shinpo*, vol. 67, no. 10, pp. 1205–14, Oct. 2015.

[263] D. S. Khalsa, “Stress, Meditation, and Alzheimer’s Disease Prevention: Where The Evidence Stands.,” *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–12, 2015.

[264] S. K. Yadav, B. Adhikary, S. Chand, B. Maity, S. K. Bandyopadhyay, and S. Chattopadhyay, “Molecular mechanism of indomethacin-induced gastropathy,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 52, no. 7, pp. 1175–1187, Apr. 2012.

[265] D. Yin, D. Tuthill, R. a Mufson, and Y. Shi, “Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression.,” *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 8, pp. 1423–8, 2000.

[266] Y. Zhang, J. Miao, and G. Hanley, “Chronic restraint stress promotes immune suppression through Toll-like receptor 4-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling,” *J. ...*, vol. 204, pp. 13–19, 2008.

[267] D.-Z. Hsu, Y.-W. Chen, P.-Y. Chu, S. Periasamy, and M.-Y. Liu, “Protective effect of 3,4-methylenedioxyphenol (sesamol) on stress-related mucosal disease in rats.,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 481827, 2013.

[268] G. E. Miller, N. Rohleder, C. Stetler, and C. Kirschbaum, “Clinical Depression and Regulation of the Inflammatory Response During Acute Stress,” *Psychosom. Med.*, vol. 67, no. 5, pp. 679–687, Sep. 2005.

[269] M. Martino, G. Rocchi, A. Escelsior, and M. Fornaro, “Immunomodulation Mechanism of Antidepressants: Interactions between Serotonin/Norepinephrine Balance and Th1/Th2 Balance,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 10, no. 2, pp. 97–123, May 2012.

[270] J. L. M. Madrigal, B. García-Bueno, J. R. Caso, B. G. Pérez-Nievas, and J. C. Leza, “Stress-induced oxidative changes in brain.,” *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, vol. 5, no. 5, pp. 561–8, Oct. 2006.

[271] K.-M. Lee *et al.*, “Protective Mechanism of Epigallocatechin-3-Gallate against Helicobacter pylori-Induced Gastric Epithelial Cytotoxicity via the Blockage of TLR-4 Signaling,” *Helicobacter*, vol. 9, no. 6, pp. 632–642, Dec. 2004.

[272] Y.-K. Yee and M. W.-L. Koo, “Anti-Helicobacter pylori activity of Chinese tea: in vitro study,” *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 14, no. 5, pp. 635–638, May 2000.

[273] M.-X. Xu, Y.-F. Zhu, H.-F. Chang, and Y. Liang, “Nanoceria restrains PM2.5-induced metabolic disorder and hypothalamus inflammation by inhibition of astrocytes activation related NF-κB pathway in Nrf2 deficient mice,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 99, pp. 259–272, Oct. 2016.

[274] L. M. Pedruzzi, M. B. Stockler-Pinto, M. Leite, and D. Mafra, “Nrf2–keap1

system versus NF-κB: The good and the evil in chronic kidney disease?," *Biochimie*, vol. 94, no. 12, pp. 2461–2466, Dec. 2012.

[275] C. Opherk *et al.*, "Inactivation of the Glucocorticoid Receptor in Hepatocytes Leads to Fasting Hypoglycemia and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus," *Mol. Endocrinol.*, vol. 18, no. 6, pp. 1346–1353, Jun. 2004.

[276] S. Bhattacharyya, D. E. Brown, J. A. Brewer, S. K. Vogt, and L. J. Muglia, "Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase," *Blood*, vol. 109, no. 10, pp. 4313–4319, May 2007.

[277] E. H. Gan and S. H. Pearce, "MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Regenerative therapies in autoimmune Addison's disease," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 176, no. 3, pp. R123–R135, Mar. 2017.

[278] K. Takeuchi, "Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility," *World J. Gastroenterol.*, vol. 18, no. 18, p. 2147, 2012.

[279] J. C. Luo, "Non-Ulcerogenic Dose of Dexamethasone Delays Gastric Ulcer Healing in Rats," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 307, no. 2, pp. 692–698, Sep. 2003.

[280] M. M. L. Cunha *et al.*, "Melanin in Fonsecaea pedrosoi: a trap for oxidative radicals.," *BMC Microbiol.*, vol. 10, p. 80, 2010.

[281] E. Dadachova and A. Casadevall, "Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, no. 6, pp. 525–531, 2008.

[282] T. R. Petrosyan, O. V Gevorkyan, I. B. Meliksetyan, A. S. Hovsepyan, and L. R. Manvelyan, "Neuroprotective action of bacterial melanin in rats after corticospinal tract lesions.," *Pathophysiology*, vol. 19, no. 2, pp. 71–80, 2012.

[283] M. E. Lacy, “Neuromelanin: a hypothetical component of bioelectronic mechanisms in brain function,” *Physiol Chem.Phys.*, vol. 13, no. 4, pp. 319–324, 1981.

[284] K. Stepień *et al.*, “Dopamine-melanin protects against tyrosine nitration, tryptophan oxidation and Ca(2+)-ATPase inactivation induced by peroxynitrite.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1523, no. 2–3, pp. 189–95, 2000.

[285] C. Schulz, K. Schütte, and P. Malfertheiner, “Helicobacter pylori and Other Gastric Microbiota in Gastroduodenal Pathologies,” *Dig. Dis.*, vol. 34, no. 3, pp. 210–216, 2016.

[286] C. Schulz, K. Schütte, and P. Malfertheiner, “Helicobacter pylori and Other Gastric Microbiota in Gastroduodenal Pathologies,” *Dig. Dis.*, vol. 34, no. 3, pp. 210–216, 2016.

[287] I. Gantz and T. M. Fong, “The melanocortin system,” *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 284, no. 3, pp. E468-74, 2003.

[288] N. Jahovic, G. Erkanli, S. Işeri, S. Arbak, and I. Alican, “Gastric protection by alpha-melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: involvement of somatostatin.,” *Life Sci.*, vol. 80, no. 11, pp. 1040–5, Feb. 2007.

[289] S. Racca *et al.*, “Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor.,” *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 81, no. 4, pp. 894–900, 2005.

[290] Я. М. Савицький, В. Й. Кімакович, and Ю. М. Федевич, “Впливмеланінунацитопротекторніпроцесиуслизовійоболонцішлунку,” *Експериментальнатаклінічнафізіологіяімедицина*, no. 1, pp. 29–30, 2001.

[291] N. Garrido, M. Meseguer, C. Simon, A. Pellicer, and J. Remohi, “Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility.,” *Asian J. Androl.*, vol. 6, no. 1, pp. 59–65, 2004.

[292] Y. J. Ji, B. Xiao, Z. H. Wang, M. Z. Cui, and Y. Y. Lu, “The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines.,” *Biomed. Environ. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 287–92, Dec. 2000.

[293] N. M. Kobyliak *et al.*, “Antioxidative effects of cerium dioxide nanoparticles ameliorate age-related male infertility: optimistic results in rats and the review of clinical clues for integrative concept of men health and fertility,” *EPMA Journal*, vol. 6, no. 1. p. 12, 2015.

[294] Д. В. Голишкін, Т. М. Фалалєєва, К. . Непорада, and Т. В. Берегова, “Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунку та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-надниркововозалозної осі за умов дії гострого стресу,” *Фізіологічний журнал*, vol. 61, no. 2, pp. 65–72, 2015.

[295] O. Y. Yefimenko *et al.*, “Nanocrystalline cerium dioxide efficacy for gastrointestinal motility: potential for prokinetic treatment and prevention in elderly,” *EPMA J.*, vol. 6, no. 1, p. 6, Dec. 2015.

[296] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, “Extracellular matrix structure,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, Feb. 2016.

[297] T. Brzozowski *et al.*, “Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves.,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 499, no. 1–2, pp. 201–13, Sep. 2004.

[298] M. M. Gaschler and B. R. Stockwell, “Lipid peroxidation in cell death.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 482, no. 3, pp. 419–425, 2017.

[299] B. Tudek, D. Zdżalik-Bielecka, A. Tudek, K. Kosicki, A. Fabisiewicz, and E. Speina, “Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 107, pp. 77–89, Jun. 2017.

ДОДАТКИ

Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. Голишкін Д.В. Вплив меланіну на слизову оболонку шлунку та масу наднирникових залоз і тимусу у щурів за умов дії стресу / Д.В. Голишкін, Т.М. Фалалєєва, Т.В. Берегова // VII Міжнародна наукова конференція

студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології", 5-8 квітня, 2011. Львів, Україна. – С. 369-370.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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