МАРКЕВИЧ Анна Олександрівна. Назва дисертаційної роботи: "ВПЛИВ ПОХІДНИХ ПІРОЛІДИН-2-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ШЛУНКУ"

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА

ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

МАРКЕВИЧ АННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 616.342-002.44(043.3)

ВПЛИВ ПОХІДНИХ ПІРОЛІДИН-2-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ НА

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ШЛУНКУ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Фалалєєва Тетяна Михайлівна

Київ – 2015

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ…………………………..………………….5

ВСТУП………………………………………………………………………………..6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ………………………………….………...……13

1.1. Фізіологічні аспекти забезпечення гомеостазу слизової оболонки шлунка.13

1.1.1. Агресивні фактори щодо слизової оболонки шлунка………………13

1.1.2. Захисні фактори слизової оболонки шлунка……………..…………17

1.2. Патогенез пептичної виразки шлунка…………………………………...…...21

1.3. Сучасні антивиразкові засоби…………………………………………….…..27

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ…….……………..……34

2.1. Використані матеріали та реактиви…………………………………………..34

2.2. Об’єкти та умови дослідження………………………………………….……35

2.3. Схема експерименту……………………………………………………….….35

2.4 Отримання біологічного матеріалу………………………………………..….37

2.5. Методика експериментального виразкоутворення у слизовій оболонці

шлунку………………………………………………………………………………38

2.6. Гістологічний аналіз слизової оболонки шлунка щурів……………….…....39

2.7. Визначення продуктів катаболізму протективних білків слизової оболонки і

пристінкового слизу шлунка………………………………………………………39

2.8. Дослідження шлункової секреції гідрохлоридної кислоти в щурів…...…...42

2.9. Визначення Н+

/K

+

-АТФазної активності…………………………………….44

2.10. Імуноферментний аналіз……………………………….……………………45

2.11. Статистична обробка даних……………………………………………..…...46

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК НА

ГОЄННЯ УРАЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ,

ВИКЛИКАНИХ РІЗНИМИ УЛЬЦЕРОГЕННИМИ

ЧИННИКАМИ………………………………………………………………..…….47

3

3.1. Пошук найбільш ефективного антивиразкового засобу серед нових

низькомолекулярних органічних сполук на моделях ульцерогенезу слизової

оболонки шлунка щурів……………………………………………………………47

3.2. Вплив лікувального введення 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату

натрію на ерозивно-виразкові ураження в слизовій оболонці шлунка щурів, на

моделях ульцерогенезу слизової оболонки шлунка щурів…………...………….56

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ 2-(2-ГІДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛІНАТУ

НАТРІЮ НА КИСЛОТО-ПЕПТИЧНИЙ ФАКТОР ВИРАЗКОУТВОРЕННЯ У

ЩУРІВ………………………………………………………………………..….….64

4.1. Вплив 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію на базальну

шлункову секрецію кислоти у щурів……………………………………...………65

4.2. Вплив 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію на карбахолінову

шлункову секрецію кислоти у щурів……………………………………..……….66

4.3. Вплив 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію на гістамінову

шлункову секрецію кислоти у щурів………………………………………..……69

4.4. Вплив 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію на Н

+

/K

+

-

ATФазну активність………………………………………………………….…….71

4.5. Вплив 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію на секрецію

пепсину у шлунку щурів……………………………………………………..…….73

РОЗДІЛ 5. СТАЛІСТЬ СЛИЗОВО-ЕПІТЕЛІАЛЬНОГО БАР’ЄРУ ШЛУНКА ТА

АНТИЗАПАЛЬНІ ЕФЕКТИ У МЕХАНІЗМАХ ДІЇ 2-(2-

ГІДРОКСИФЕНОКСИ)АЦЕТИЛ)-L-ПРОЛІНАТУ НАТРІЮ…………………..76

5.1. Стан слизового бар’єру за умов експериментального виразкоутворення та

лікувальної дії 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію…………….77

5.2. Вміст простагландину Е2 в крові за умов експериментального

виразкоутворення та лікувального введення 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-Lпролінату натрію………………………………………………………………..…..83

5.3. Стан прозапальної системи крові за умов експериментального

виразкоутворення та лікувального введення 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-Lпролінату натрію……………………………………………………………………85

4

5.4. Стан антизапальної системи крові за умов експериментального

виразкоутворення та лікувального введення 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-Lпролінату натрію………………………………………………..…………………..93

ЗАКЛЮЧЕННЯ……………………………..…………………………………….100

ВИСНОВКИ……………………………………………………………………….110

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…………………………………………112

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

EGF – епідермальний фактор росту

NF-κB – ядерний фактор κB

TGF – трансформуючий фактор росту

VEGF – фактор росту ендотелію судин

ВІС – водно-іммобілізаційний стрес

ІЛ – інтерлейкін

ІПП – інгібітори протонної помпи

ІНФ – інтерферон

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати

ПГ – простагландини

СОШ – слизова оболонка шлунка

ФНП – фактор некрозу пухлин

ШКТ –

2,2-ГФА-L-П -

шлунково-кишковий тракт

2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-L-пролінату натрію

6

ВСТУП

Актуальність теми. Ритм життя сучасного суспільства призводить до

виснаження адаптивних можливостей організму. На тлі стресу, якому підлягає

людина сьогодні, патологічні зміни в органах є невід’ємною складовою

організму більшості людей. Періодичні головні та болі в інших органах як

наслідок перевантажень є причиною того, що важко знайти сучасну людину,

яка б ніколи не вживала нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП). Важке

соціально-економічне становище нашої держави обумовлює жахливу

статистику і щодо споживання алкоголю: через алкоголізм помирає понад 40

тисяч людей щороку. Наведені чинники здійснюють негативний вплив на

здоров’я населення і найпершим органом, що страждає від їх впливу є шлунок.

Стрес, НПЗП, етанол порушують баланс між факторами агресії та захисту

шлунка, що призводить до розвитку виразкових дефектів [1, 2].

Від уражуючої дії наведених факторів найпершим страждає слизовобікарбонатний-фосфоліпідний бар’єр, який відмежовує агресивний вміст

шлунку від розташованих глибше шарів [3]. При виразці відбувається протеоліз

мукопротеїнів та зменшення їх синтезу у зв’язку з руйнуванням мукоцитів [4-

6]. Вітчизняними дослідниками було доведено, що при пептичній виразці в

результаті посиленої деградації глікозаміногліканів, фукопротеїнів,

колагенових білків знижується резистентність слизової оболонки шлунка

(СОШ) [7].

Внаслідок зменшення захисних властивостей СОШ, гідрохлоридна

кислота здійснює руйнівний вплив на слизову оболонку, ускладнюючи

протікання патологічного процесу. Тому антисекреторні препарати

залишаються «золотим стандартом» у лікуванні пептичної виразки. В наш час

як антисекреторні препарати найчастіше застосовують інгібітори протонної

помпи (ІПП), що є похідними бензимідазолу (омепразол, рабепразол,

езомепразол, пантопразол) [8]. ІПП швидко і ефективно знижують Н

+

/К+

-

7

АТФазну активність, внаслідок чого знижується секреція кислоти. Одночасно з

цим їх застосування призводить до цілої низки негативних побічних ефектів, а

саме: морфо-функціональні зміни клітин СОШ, онкогенні зміни, атрофічний

гастрит, зниження синтезу мРНК пепсиногену, інгібування синтезу

простагландину (ПГ) Е2 [8]. На тлі гіпоацидності погіршується засвоєння

вітаміну В12 і йонів кальцію, заліза та магнію [9]. У хворих, які приймають ІПП,

спостерігається більша частота рецидивів інфекції Clostridium difficile,

пневмонії, інтерстиціального нефриту, остеопорозу [10, 11]. Припинення

застосування ІПП спричинює компенсаторний ефект активації виділення

гідрохлоридної кислоти та рецидиву пептичної виразки [11]. Тривале

використання даних препаратів може стати причиною смерті, насамперед у

людей похилого віку, що страждають хронічними захворюваннями [12]. Таким

чином, на сьогоднішній день залишається актуальною проблемою розробка

нових антисекреторних та антивиразкових препаратів з мінімальними

побічними ефектами, вивчення їх хімічних та біологічних властивостей,

механізмів дії та можливості застосування їх у клініці. Дійсно, продовжується

пошук нетоксичних препаратів з антивиразковою активністю, синтетичного та

природного походження, про що свідчить опублікування більше 700 статей за

даною темою в базі даних PubMed за 2014-2015 роки.

Серед перспективних антивиразкових сполук увагу науковців

привертають поліфеноли природнього походження, антиоксидантна і

антивиразкова дія яких показана численними дослідженнями [13-17]. Також

було встановлено, що пролінвмісні пептиди здатні захищати СОШ від уражень

та знижувати секрецію гідрохлоридної кислоти [18, 19]. Враховуючи отримані

результати, цікавим було об’єднання властивостей фенол- і пролінвмісних груп

в одній сполуці. Дане завдання було реалізоване в синтезі нових

низькомолекулярних сполук, що є фенольними похідними піролідин-2-

карбонових кислот (проліну). Дослідження впливу нових низькомолекулярних

органічних сполук на гоєння уражень в шлунку, викликаних різними

ульцерогенними чинниками, обумовило мету і завдання цієї роботи.

8

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу

виконано у відділенні біологічних та біомедичних технологій НДЛ

«Фармакології та експериментальної патології» ННЦ «Інститут біології»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках

науково-дослідних тем: № 11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно -

компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-

2015р.р., № д/р 0111U004648) та № 13ДП036-03 (М/282-2013) «Проведення

проблемно-орієнтованих пошукових досліджень і створення науковотехнічного доробку з удосконалення методів терапії виразкових патологій

шлунково-кишкового тракту» на замовлення Державного агентства з питань

науки, інновацій та інформатизації України (2012-2013 р.р. № д/р

0113U005510).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було дослідження впливу

нових низькомолекулярних органічних сполук похідних піролідин-2-

карбонових кислот на ерозивно-виразкові ураження в СОШ, викликані водноіммобілізаційним стресом (ВІС), етанолом, НПЗП, та встановлення

фізіологічних механізмів їх антивиразкової дії:

1. Дослідити лікувальну дію нових 6-ти низькомолекулярних органічних

сполук похідних піролідин-2-карбонової кислоти на ерозивно-виразкові

ураження в СОШ щурів, які були викликані ВІС, етанолом, аспірином та

індометацином.

2. Провести гістоморфологічні дослідження ерозивно-виразкових уражень

шлунка при вивченні лікувальної дії 2-(2-гідроксифенокси)ацетил)-Lпролінату натрію (2,2-ГФА-L-П).

3. Вивчити вплив 2,2-ГФА-L-П на секрецію гідрохлоридної кислоти та

пепсину в шлунку щурів.

4. Визначити вміст вільних оксипроліну, фукози та гексуронових кислот в

СОШ, а також ПГЕ2 в сироватці крові за умов введення низькомолекулярної

органічної сполуки після розвитку ерозивно-виразкових уражень різної

етіології в шлунку щурів.

9

5. Визначити вміст прозапальних (інтерлейкіну (ІЛ) 1β та 12р40, інтерферону

(ІНФ)-γ, фактору некрозу пухлин (ФНП)-α) та антизапальних (ІЛ 4 та 10,

фактору росту пухлин (ФРП)-β) цитокінів у сироватці крові щурів після

моделювання стресових, етанолових, аспіринових та індометацинових

уражень СОШ та введення 2,2-ГФА-L-П.

Об’єкт дослідження – фізіологічні механізми функціонування СОШ

щурів за умов розвитку ерозивно-виразкових уражень.

Предмет дослідження – вплив похідних піролідин-2-карбонової кислоти

на ураження в СОШ, викликані ВІС, етанолом та НПЗП, секреторна функція

шлунка, стан слизово-епітеліального бар’єру, цитокіновий профіль за умов

уражень СОШ та лікувального введення 2,2-ГФА-L-П.

Методи дослідження: фізіологічні, гістоморфологічні, біохімічні та

методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було встановлено

антивиразковий ефект терапевтичної дії нових низькомолекулярних органічних

сполук похідних піролідин-2-карбонової кислоти, в хімічній структурі яких

були поєднані пролінова та фенольна групи, на гоєння уражень, викликаних

ВІС, етанолом, аспірином та індометацином. Доведений найбільш виражений

загоюючий вплив на ураження в шлунку сполуки 2,2-ГФА-L-П за умов її

введення після моделювання ерозивно-виразкових уражень. Вперше виявлені

антисекреторні властивості 2,2-ГФА-L-П та підтверджено зменшенням

базальної та стимульованої секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів за

умов введення даної речовини. Показано зменшення активності пепсину в

шлунку під впливом досліджуваної субстанції. Разом з антисекреторним

ефектом це свідчить, що один з фізіологічних механізмів дії досліджуваної

сполуки – це вплив на кислото-пептичний фактор агресії. Вперше доведено

зміцнення слизово-епітеліального бар’єру шлунка щурів за умов введення 2,2-

ГФА-L-П після моделювання ерозивно-виразкових уражень, що

підтверджувалось зменшенням в СОШ вільних оксипроліну, фукози та

гексуронових кислот, як показників деградації колагенових і неколагенових

протективних білків слизової. Нами було встановлено збільшення ПГЕ2 під

10

впливом терапевтичного введення 2,2-ГФА-L-П за умов стресової моделі та

уражень, викликаних НПЗП, що може бути одним з чинників посилення

слизового бар’єру шлунка щурів. На тлі введення 2,2-ГФА-L-П після

моделювання ерозивно-виразкових уражень було зареєстроване суттєве

зменшення вмісту прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-12В р40 та ФНП-α) в крові

щурів, що підтверджує антизапальні властивості сполуки за умов

виразкоутворення. Антизапальна дія досліджуваної сполуки також

підтверджувалася підвищенням вмісту ІЛ-4 та відновленням вмісту ІЛ-10 до

показників інтактних тварин. Відсутність вираженої дії 2,2-ГФА-L-П на

антизапальні цитокіни може свідчити про те, що антизапальний ефект сполуки

є наслідком загоєння уражень та загального відновлення гомеостазу СОШ.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати

свідчать, що сполука 2,2-ГФА-L-П за умов введення після дії ульцерогенного

чинника зменшує площу ерозивно-виразкових уражень, володіє

антисекреторними та антизапальними властивостями, зменшує вміст продуктів

деградації захисних білків (оксипроліну, фукози та гексуронових кислот) в

СОШ, стимулює синтез ПГЕ2. Наведені дані дозволяють заключити про

ефективність даної речовини та рекомендувати її для досліджень молекулярних

механізмів дії, а також для визначення її токсичності з подальшими

рекомендаціями щодо застосування у клінічній практиці.

Результати роботи впроваджені в навчальний процес на кафедрі фізіології

людини і тварин ННЦ «Інститут біології» Київського національного

університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Здобувачка самостійно опрацювала

наукові праці з обраної тематики, що наведені в списку літературних джерел,

провела експерименти, обрахувала статистичні дані з порівнянням отриманих

результатів з роботами інших авторів. Мета і завдання роботи були

сформульовані за участю наукового керівника д.б.н., ст.н.с. Фалалєєвої Т.М. З

науковим керівником була обговорена концепція представлення результатів та

сформульовано коректні висновки. Ідея обраного напряму роботи належить

д.б.н., проф. Остапченко Л.І. Досліджувані похідні піролідин-2-карбонової

11

кислоти були синтезовані та люб’язно надані Кудрявцевим К.В., к.хім.н.,

доцентом Московського державного університету імені М.В.Ломоносова.

Апробація результатів дисертації. Основні результати експериментів

були представлені на всеукраїнських та міжнародних науково-практичних

конференціях та конгресах:

- X Ювілейній міжнародній медико-фармацевтичній конференції

студентів і молодих вчених (Чернівці, 2013);

- X Міжнародній Кримській конференції «Космос та біосфера»

(Коктебель, Крим, 2013);

- V Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біологічні

дослідження – 2014» молодих учених і студентів (Житомир, 2014);

- 21-ому Міжнародному студентському конгресі з біомедичних наук

(Гронінген, Нідерланди, 2014);

- ХІІІ Міжнародній науковій конференції молодих вчених

«Шевченківська весна: біологія-2015» (Київ, 2015).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 12 наукових праць,

у тому числі 7 статей [20-26], 2 з яких у міжнародних журналах, що цитуються

в науково-метричній базі Scopus, та 5 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та

міжнародних наукових конференцій та з’їздів [27-31].

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі

вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 3-х розділів

результатів власних досліджень з їх обговоренням, заключення, висновків,

списку використаних літературних джерел (254 посилань). Дисертація

викладена на 136 сторінках і проілюстрована 34 рисунками та 3 таблицями.

Висновок біоетичної експертизи. Робота була виконана на білих

лабораторних щурах розведення віварію Навчально-наукового центру

«Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса

Шевченка. Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах

акредитованого віварію згідно «Стандартним правилам з упорядкування,

обладнання та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Впродовж усього експерименту тварини не зазнавали жорстокого і негуманного

12

поводження за висновком комісії з питань біоетики Навчально-наукового

центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса

Шевченка протокол № 3 від 10 березня 2015 року. Дослідження відповідають

основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами

згідно правил Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які

використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях

[32], у відповідності до Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист

тварин від жорстокого поводження» [33] та згідно з етичними нормами і

правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996) [34].

ВИСНОВКИ

Дисертаційнедослідженняпідтверджуєефективністьзастосування

низькомолекулярноїорганічноїсполукигідроксифеноксиацетилпролінатунатріюдляприскореннязаживленняураженьвслизовійоболонці

шлункащуріввикликанихтакимиульцерогеннимифакторамиякстресетанол

танестероїдніпротизапальнізасобиРезультатироботирозкривають

фізіологічнімеханізмизалученівлікувальніефектидосліджуваноїсполукиа

самеїївпливнакислотопептичнийфакторагресіївшлункупопередження

руйнуваннязахиснихглікопротеїдівслизузменшенняінтенсивностізапальних

процесівворганізмінатліерозивновиразковихураженьтапосилення

виділенняцитопротективногопростагландинуЕАналізотриманихданих

дозволивзробитинаступнівисновки

Наосновідослідженнянизькомолекулярнихз’єднаньпохідних

піролідинкарбоновоїкислотизробленовисновокщонайбільшвиражена

антивиразковаактивністьналежитьсполуцігідроксифеноксиацетилпролінатнатрію

Привведенніорганічноїсполукигідроксифеноксиацетилпролінатнатріювпродовждібпісляульцерогенногочинникамоделювання

ВІСвведенняетанолутанестероїднихпротизапальнихпрепаратів–

індометацинутааспіринуплощаерозивновиразковихураженьслизової

оболонкишлункаменшапорівнянозконтролем

Низькомолекулярнаорганічнасполукагідроксифеноксиацетилпролінатнатріюефективнозменшуєвпливкислотопептичногофакторуагресії

вшлункучереззниженнябазальноїтастимульованоїкарбахоліномсекреції

гідрохлоридноїкислотитапепсинуОписанийвпливздійснюєтьсячерез

інгібування







АТФазноїактивностівслизовійоболонцішлунка

Досліджуванасполукапридобовомувведеннізахищаєслизовоепітеліальнийбар’єршлункавіддеградаціїзаумовураженьслизовоїоболонки



шлункарізногоґенезущопідтверджуєтьсязменшеннямоксипролінуфукози

тагексуроновихкислотякієпродуктамикатаболізмузахиснихбілківслизу

Механізмомтакоговпливунаслизовийбар’єрєпосиленнявиділення

цитопротективногопростагландинуЕ

гідроксифеноксиацетилпролінатнатріюзнижуєінтенсивність

системногозапаленнязаумоввиразкоутворенняпрощосвідчитьзменшення

рівняпрозапальнихцитокінівінтерлейкінуβфакторунекрозу

пухлинαінтерферонуγвсироватцікровіщурів