Голишкін Дмитро Віталійович, фахівець з доклі- нічних досліджень відділу доклінічних і клінічних досліджень ТОВ &laquo;Юрія-фарм&raquo;: &laquo;Вплив меланіну та нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунка та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресу&raquo; (03.00.13 - фізіологія люди-

ни і тварин). Спецрада Д 26.001.38 у Київському на&shy;ціональному університеті 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 – 2018

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……………………………………………11

ВСТУП……………………………………………………………………………..12

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ………………………………………………...17

1.1. Патогенез виразкової хвороби та стратегії лікування……………………17

1.2. Стрес, як загальний адаптаційний синдром організму………………….. 20

1.2.1. Механізми стрес-індукованого ураження СОШ……………………21

1.3. Перспективи використання похідних поліфенольних сполук, як

гастропротекторних препаратів…………………………………………… 24

1.4. Класифікація та синтез меланінів…………………………………………..27

1.4.1. Біологічна роль і функції меланінів…………………………………31

1.4.2. Перспективи використання меланіну, як наносполуки…………….35

1.5. Біологічна роль і функції нанокристалічного діоксиду церію…………...37

1.5.1. Фізикохімічні властивості НДЦ та показники токсичності……….38

1.5.2. Накопичення та виведення нанокристалічного діоксиду церію в

організмі……………………………………………………………………..41

1.5.3. Механізм антиоксидантної ензимо-міметичної активності НДЦ ...41

1.5.4. Гастропротекторний вплив нанокристалічного діоксиду церію….43

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ…………………………48

2.1. Умови та схема проведених експериментів……………………………….48

2.1.2 Групи тварин з дослідження впливу меланіну за умов дії стресу...51

2.1.3. Групи тварин з дослідження нанокристалічного діоксиду церію за

умов дії стр…………………………………………………………………………52

2.2. Метод нервово-м’язового напруження за Сельє………………..52

2.3. Забір біологічних зразків…………………………………………………...53

2.4. Визначення продуктів катаболізму білків слизової оболонки і

пристінкового слизу шлунку…………………………………………………… 54

11

2.5. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенаті

слизової оболонки шлунку щурів……………………………………………….56

2.6. Визначення активності ферментів антиоксидантної системи у гомогенаті

слизової оболонки шлунку щурів……………………………………………….58

2.7. Підготовка та фарбування мазків крові щурів…………………………….59

2.8. Підрахунок лейкоцитів……………………………………………………..63

2.9. Визначення вмісту кортизолу у сироватці крові щурів……………..……63

2.10. Визначення вмісту адренокортикотропного гормону у сироватці крові

щурів………………………………………………………………………………64

2.11. Метод визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних

мембран……………………………………………………………………………65

2.12. Аналіз вмісту цитокінів в сироватці крові щурі…………………………..65

2.13. Статистична обробка даних……………………………………….66

РОЗДІЛ 3………………………………………………………………………….56

ВПЛИВ МЕЛАНІНУ ТА НАНОКРИСТАЛІЧНОГО ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ НА

СТАН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ТА РЕАКЦІЮ КОРИ

НАДНИРНИКІВ ЗА УМОВ ДІЇ ГОСТРОГО СТРЕСУ………………………...56

3.1 Дослідження стреспротективної дії досліджуваних речовин………………69

3.1.1. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на розвиток уражень в

слизовій оболонці шлунку за умов нервово – м’язового напруження…………69

3.1.2 Визначення впливу меланіну та НДЦ на зміну маси органів стрес

протекторної системи……………………………………………………………..76

3.1.3. Стан слизового бар’єру шлунку за умов нервово – м’язового

напруження та профілактичного введення меланіну та НДЦ………………….79

3.2 Дослідження антиоксидантних властивостей досліджуваних речовин…...86

3.2.1. Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан прооксидантної

системи щурів………………………………………………………………………86

3.2.2 Дослідження впливу меланіну та НДЦ на стан антиоксидантної

системи щурів………………………………………………………………………91

3.3. Встановлення антизапальних властивостей досліджуваних речовин

12

3.3.1. Визначення впливу меланіну та НДЦ на лейкоцитарну формулу крові

щурів………………………………………………………………………….95

3.3.2. Вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов нервово-м’язового

напруження та введення меланіну та НДЦ……………………………………….98

3.5. Вплив меланіну на рівень гормонів кортизолу та адренокортикотропного

гормону щурів за умов нервово-м’язового напруження……………………….106

3.6. Визначення електричних характеристик бімолекулярних ліпідних

мембран……………………………………………………………………………110

УЗАГАЛЬНЕННЯ………………………………………………………………...114

ВИСНОВКИ……………………………………………………………………….129

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ…………………………………….131

13

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АКТГ – адренокортикотропний гормон

АФК – активні форми кисню

БЛМ – бімолекулярні ліпідні мембрани

ВХ – виразкова ховроба

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

14

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 гастродуоденальної 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 Н2-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

15

мікроорганізми Pseudonadsoniella brunea (раніше Nadsoniella nigra Х-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 наднирників 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

16

замовлення Держінформнауки ДУ «Національний антарктичний науковий

центр» Міністерства освіти і науки України №H/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 ерозивновиразкові 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 окисноантиоксидантної рівноваги, маркери запалення.

17

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 нервовом’язовим напруженням за Сельє.

Оскільки меланін, виявився більш ефективним цитопротектором - автор

продовжив більш детально з’ясовувати механізм його дії. Досліджено механізм

проникнення меланіну через центральну гідрофобну зону клітинних мембран

модельних бімолекулярних ліпідних мембран. Показано, що меланін знижує

гіперактивацію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи за умов дії

стресу, що підтверджується відновленням рівня кортизолу та АКТГ та

зменшенням маси наднирників. 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

18

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); ІІІ Международная научнопрактическая конференция «Достижения молодых ученых в развитии

инновационных процессов в экономике, науке, образовании» (Брянск, 2011); 4th

19

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); VІ

Міжнародна Антарктична Конференція "Інтерналізація досліджень в Антарктиці

– шлях до духовної єдності людства" (Київ, 2013); ІІ 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); VІІ Міжнародна Антарктична Конференція

"Антарктичні дослідження: нові горизонти та пріоритети" (Київ, 2015); Науковопрактична 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.

ВИСНОВКИ

Дисертаційнароботаприсвяченавивченнювпливумеланінута

нанокристалічногодіоксидуцеріюнастанслизовоїоболонкишлункутареакцію

коринаднирниківзаумовдіїгострогостресуМеланінтананокристалічний

діоксидцеріюНДЦзміцнюютьслизовийбар’єршлункувиявляють

антиоксидантніантизапальнітаімуномодулюючівластивостівідновлюють

функціонуваннягіпоталамогіпофізарнонаднирниковоїсистемипри

іммобілізаційномустресізаСельєщосвідчитьпроважливістьданихсполуку

підтриманнігомеостазуорганізмутаслизовоїоболонкишлункуСОШНа

основірезультатівзробленінаступнівисновки

ПрофілактичневведеннямеланінутаНДЦсуттєвозменшувало

площувиразковихураженьслизовоїоболонкишлункунарта

рвідповідновикликаніметодомнервовом’язового

напруженнязаСельє

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порівнняннізНДЦсвідченнямчогоє

зменшенняконцентраціївільногооксипролінунарпроти

рвідповіднофукозинапротир

відповіднотагексуроновихкислотнарпроти

рвідповідно

Післятрьохгодиндіїнервовом’язовогонапруженнязаСельє

коефіцієнтмасинаднирниківзроставтодіяктимусузменшувавсяЗаумов

профілактичноговведеннямеланінутаНДЦпоказникикоефіцієнтумаси

наднирниківтатимусувідновлювалисядоконтрольнихзначень