

УДК 57.018.34:619:615:612.176

Д. В. Голишкін, Т. М. Фалалеева, В. М. Кухарський, Н. В. Чижанська\*, Т. В. Берегова

## ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА УРАЖЕННЯ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ЩУРІВ, ВИКЛИКАНІ МЕТОДОМ НЕРВОВО-М'ЯЗОВОГО НАПРУЖЕННЯ ЗА СЕЛЬЄ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

\*Полтавська державна аграрна академія (м. Полтава)

Дослідження проведені відповідно до Державної програми проведення досліджень в Антарктиці на 2002-2010 рр. «Пошук найбільш ефективного продуцента меланіну в Антрактиці та дослідження його функціональних властивостей», номер державної реєстрації 01047U001950.

**Вступ.** На сьогодні хвороби органів травлення посідають третє місце в загальній структурі хронічної захворюваності населення України та друге – у структурі первинної хронічної захворюваності [17]. Серед хвороб органів травлення чільне місце належить виразковій хворобі шлунка та дванадцятипалої кишки, захворюваність на які зростає. З 1997 р. по 2004 рр. в Україні темп приросту показника поширеності даної патології склав 22, 4% [18]. Зростання поширеності виразкової хвороби, на нашу думку, не пов'язано із збільшенням інфікування населення *Helicobacter pylori*, якому відводять провідну роль у формуванні пептичної виразки [1, 11, 22], так як у 15-40% виразкова хвороба не асоційована з *Helicobacter pylori* [21].

Дані літератури переконливо свідчать, що найчастіше виразкова хвороба, яка не асоційована з *Helicobacter pylori*, пов'язана з впливом стресу на організм людини [1, 11, 22]. Інфікування *Helicobacter pylori* погіршує протікання виразкової хвороби, патогенез якої пов'язаний з іншими чинниками: виразковий дефект рубцюється повільніше та зменшується тривалість періодів ремісії. Дійсно, сучасне суспільство характеризується все більшим поширенням «хвороби цивілізації», патогенетичною основою яких є емоційний стрес [24]. При цьому хронічні несприятливі впливи, яких зазнає організм людини в умовах техногенного пресингу, соціальної нестабільності, напруженого ритму життя можуть бути як головним, так і додатковим етіологічним чинником багатьох захворювань. За умов дії стресу функціональні резерви організму знижуються, зменшується здатність до адаптації, і підтримання гомеостазу здійснюється за-

вдяки значній напрузі регуляторних систем. Все це зумовлює пошук і впровадження адаптогенів природного походження, використання яких активує компоненти локальної стрес-лімітуючої системи, що відіграє важливу роль у формуванні захисних реакцій проксимального відділу органів травлення [6, 10].

Результати багатьох досліджень дозволяють стверджувати, що до адаптогенів природного походження можна віднести меланін [2, 3, 23]. Дійсно, на сьогодні проведена достатньо велика кількість робіт, яка переконливо свідчить про антивиразкову дію меланіну та його антиоксидантні властивості [13, 14]. Проте жодного разу дослідники не використали класичну модель виразкоутворення за Сельє, автора теорії впливу стресу на організм та адаптації до нього. Даний метод рекомендований Державним фармакологічним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів [15].

**Метою роботи** явилось дослідження впливу меланіну на розвиток уражень в слизовій оболонці шлунка (СОШ) щурів, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє, та стану про- та антиоксидантної системи в СОШ.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведені на 30 білих нелінійних щурах - самках, масою 120-150 г, 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), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі [9, 12]. 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.

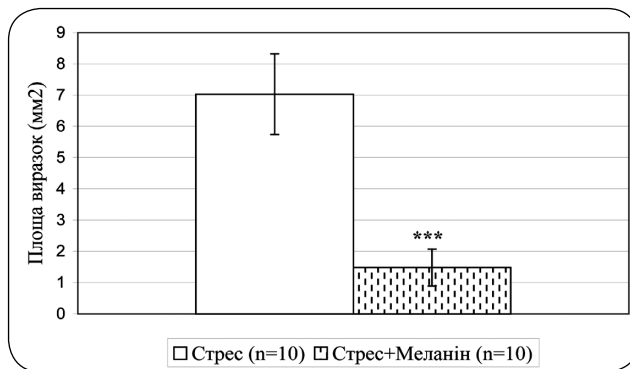
Всі тварини були розділені на 3 групи по 10 в кожній. Щури першої групи слугували контролем (інтактні тварини). Щури другої та третьої груп були піддані дії стресу, який моделювали методом нервово-м'язового напруження за Сельє [15]. Щурів іммобілізували на операційному столі на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Тривалість іммобілізації складала 3 години. Через 2 години після закінчення дії стресу щурів контрольної та дослідної груп умертвляли за допомогою летальної дози уретану (3 г/кг, в/о) [20]. Після чого діставали шлунок, розрізали по малій кривизні, вивертали слизовою назовні та ретельно промивали, на гастроскопі при транслюмінаційному освітленні за допомогою лупи (x4) проводили ретельний огляд СОШ. Диференційно підраховували площу виразок та довжину ерозій.

Щурам другої групи перед нанесенням стресу внутрішньошлунково (в/ш) вводили плацебо (0, 5 мл води). Щурам третьої групи перед нанесенням стресу вводили меланін в дозі 5 мг/кг, розчиненому в 0, 5 мл води. Продукентом меланіну, використаного в наших дослідженнях, є дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам Х1, що були висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська Антарктична станція академік Вернадський).

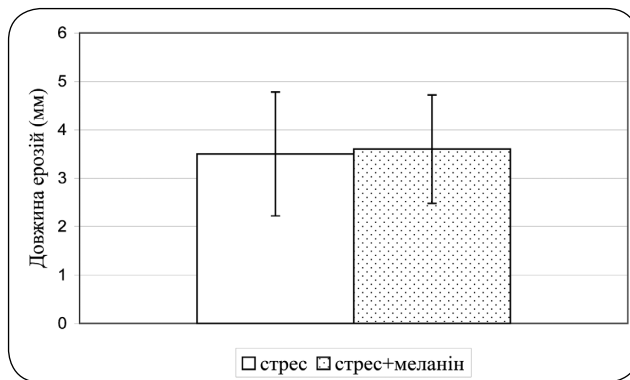
В гомогенаті СОШ щурів визначала вміст основних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – дієнових кон'югатів спектрофотометричним методом [4], ТБК-активних продуктів по реакції з тіабарбітуровою кислотою [16] та Шифових основ флюорометричним методом [7]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю ферментів супероксиддисмутази (СОД) [19] та каталази (КАТ) [8].

Отримані 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  $p < 0, 05$  [5].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Встановлено, що через 2 години після закінчення дії стресу в СОШ щурів контрольної групи розвивались виразки та ерозії, площа та довжина яких відповідно складала 7, 03±1, 29 мм<sup>2</sup> та 3, 50±1, 28 мм з



**Рис. 1.** Вплив меланіну на площу виразок в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє, М+m, \*\*\* -  $p < 0, 001$ , відповідно до контролю.



**Рис. 2.** Вплив меланіну на довжину ерозій в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє, М+m.

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 складала 1, 48±0, 59 мм<sup>2</sup> та 3, 6±1, 12 мм (рис. 1).

Тобто, меланін на 79% ( $p < 0, 001$ ) зменшував площу виразок, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Що стосується ерозій, то зменшення їх довжини було статистично недостовірним (рис. 2).

Вплив меланіну на розвиток оксидативного стресу у СОШ за умов дії стресового фактору оцінювали за вмістом основних продуктів ПОЛ та активністю ферментів першої лінії захисту клітин від вільних радикалів – СОД та КАТ.

Встановлено, що в СОШ щурів контрольної групи вміст первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів складав 211, 97±17, 84 нМольхмг білка-1. Через 2 години після дії стресу рівень дієнових кон'югатів зростав до

Таблиця 1

Вплив меланіну на вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенаті слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки, ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Група тварин Досліджуваний параметр	Контроль	Стрес	Стрес + Меланін
Дієнові кон'югати, нМоль х мг білка <sup>-1</sup>	211, 97 ± 17, 84	345, 68 ± 24, 56*	209, 88 ± 12, 37###
ТБК-активні сполуки, нМоль х мг білка <sup>-1</sup>	102, 71 ± 7, 53	203, 87 ± 13, 62*	114, 74 ± 7, 71###
Шиффові основи, ум. од. х мг білка <sup>-1</sup>	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.

345, 68±24, 56 нМольхмг білка-1, або на 63% ( $p < 0, 05$ ) (табл. 1). 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 нМольхмг білка-1.

При визначенні проміжних продуктів ПОЛ у СОШ щурів, які були піддані дії стресу, рівень ТБК-активних продуктів складав 203, 87±13, 62 нМольхмг білка-1 проти 102, 71±7, 53 нМольхмг 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 нМольхмг білка-1 (табл. 1).

Аналогічну дію меланін справляв на кінцеві продукти ПОЛ - Шиффові основи. В контрольній групі тварин рівень Шиффових основ дорівнював 5, 80±0, 36 ум. од. хмг білка-1. Через дві години після дії стресу він досягав значення 10, 56±0, 61 ум. од. хмг 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. хмг білка-1 (табл. 1).

Показником розвитку оксидативно-го стресу в клітині може слугувати не тільки збільшений рівень продуктів ПОЛ й активність ферментів антиоксидантної системи, здатних підтримувати ступінь ПОЛ в фізіологічно прийнятних межах.

Важливими ферментами антиоксидантної системи є СОД, яка перетворює супероксид-

ний радикал у перекис водню, та КАТ, яка інактивує утворений с СОД пероксид водню. Завдяки такій спільній роботі цих ферментів вміст активних форм кисню тримається в межах фізіологічної норми.

В контрольній групі щурів активність СОД та КАТ у гомогенаті СОШ складала 0, 41±0, 03 ум. од. ххв-1хмг білка-1 та 9, 01±0, 51 мкМольххв-1хмг білка-1 відповідно (табл. 2). Через дві години після дії стресу активність ферментів антиоксидантного захисту зростала: активність СОД складала 0, 53±0, 04 ум. од. ххв-1хмг білка-1, а активність КАТ - 12, 37±0, 98 мкМольххв-1хмг білка-1, що відповідало зростанню активності СОД та КАТ на 29% ( $p < 0, 05$ ) та 37% ( $p < 0, 05$ ) відповідно. Введення меланіну щурам перед нанесенням стресу сприяло подальшому збільшенню активності СОД. При цьому вона сягала значення 0, 68±0, 05 ум. од. ххв-1хмг білка-1, що на 65, 9% ( $p < 0, 05$ ) перевищувало даний показник в контролі і на 28, 3% ( $p < 0, 05$ ) перевищувала активність СОД в СОШ щурів, підданих дії стресу. Що стосується активності КАТ, то за умов дії меланіну на фоні стресу її значення не відрізнялося від контрольних значень і складало 10, 21±0, 62 мкМольххв-1хмг білка-1.

Таким чином, за умов стресової виразки, у клітинах СОШ щурів відбувалося зростання вмісту вільних радикалів. Оскільки субстратом активних форм кисню є ненасичені ліпіди мембран, це призводило до інтенсифікації процесів ПОЛ та зростанню вмісту їх продуктів.

Отримані результати експериментальних досліджень свідчать про те, що стрес викликав зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у бік активації вільнорадикальних процесів.

Таблиця 2

Вплив меланіну на активність ферментів антиоксидантного захисту у гомогенаті слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки, (M ± m, n=6)

Досліджуваний показник \ Група тварин	Контроль	Стрес	Стрес + Меланін
Супероксиддисмутаза, ум. од. х хв <sup>-1</sup> х мг білка <sup>-1</sup>	0, 41 ± 0, 03	0, 53 ± 0, 04*	0, 68 ± 0, 05*#
Каталаза, мкМоль х хв <sup>-1</sup> х мг білка <sup>-1</sup>	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.

При цьому відбувалось зростання вмісту продуктів ПОЛ та компенсаторна реакція підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту клітин СОШ: СОД та КАТ.

Профілактичне введення меланіну щурів перед нанесенням стресу, призвело до відновлення порушеної окисно-антиоксидантної рівноваги у СОШ в стадію напруги за Сельє. Так, вміст продуктів ПОЛ повертався до контрольного рівня. Активність ферменту першої лінії захисту клітин від вільних радикалів – СОД під впливом меланіну зростала, проте активність КАТ поверталася до контрольних значень. Це свідчить про те, що хоча генерація перекису водню під впливом меланіну у стресованих тварин відбувається швидше, так як активність СОД була ще більшою, ніж за умов ізольованої дії стресу, проте він інактивується тим же меланіном, так як активність КАТ та рівень продуктів ПОЛ не відрізняється від контролю.

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.

**Висновки.**

1. Меланін зменшував виразково-ерозивні ураження слизової оболонки шлунка, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє, у фазу напруги.

2. Профілактичне введення меланіну щурів, призвело до відновлення порушеної окисно-антиоксидантної рівноваги у СОШ.

**Перспективи подальших досліджень.** Одержані дані свідчать про те, що меланін проявляє властивості стреспротектора та адаптогена і є перспективним засобом профілактики та лікування наслідків дії стресу на організм.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Аруин Л. И. Регенерация гастродуоденальных язв и Helicobacter pylori. Как язва становится хронической / Л. И. Аруин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология – 2002. - № 1. – С. 113-114.
2. Барабой В. А. Меланин, структура, биосинтез, биологические функции / В. А. Барабой // Украинский биохимический журнал. – 1999. – Т. 71, № 4. – С. 5-14.
3. Борщевская М. И. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов / М. И. Борщевская, С. М. Васильева // Вопросы. Медицинской химии. – 1999. – Т. 45, № 1. – С. 13-24.
4. Гаврилов В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лабор. дело. – 1988. - №2. - С. 60-63.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. - М.:Практика, 1998. –459с.
6. Заячківська О. С. До питання молекулярних механізмів локальної стрес-лімітуючої системи органів травлення / О. С. Заячківська, М. Р. Гжегоцький, М. М. Кшик // Таврический медико-биологический вестник. – 2003. – Т. 7, № 1. – С. 34-38.
7. Колесова О. Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лабор. дело. – 1984. - №9. - С. 540 - 546.
8. Королук М. А. Метод активности каталазы / М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лабор. дело. – 1998. - №1. – С. 16-19.
9. Мальцев В. И. Этическая оценка методик проведения исследований / В. И. Мальцев, Д. Ю. Белоусов // Ежегодник Аптека. – 2001. - № 34. - С. 35.
10. Манухина Е. Б. Стресс-лимитирующая система оксид азота / Е. Б. Манухина, И. Ю. Малышев // Российский физиологический журнал – 2000. – Т. 86, № 10. – С. 1283-1292.
11. Передерий В. Г. Язвенная болезнь: прошлое, настоящее, будущее / В. Г. Передерий, С. М. Ткач, С. В. Скопиченко - Київ, Б. І. , 2003. – 256 с.
12. Покровский В. И. Биомедицинская этика / В. И. Покровский - М. , 1997. - 224 с.
13. Савицький Я. М. Вплив меланіну на експериментальне виразкоутворення у щурів / Я. М. Савицький, В. Й. Кімакович // Вісник проблем біології і медицини. – 2000. - № 4. – С. 33-36.
14. Савицький Я. М. Вплив меланіну на цитопротекторні процеси у слизовій оболонці шлунка / Я. М. Савицький, В. Й. Кімакович, Ю. М. Федевич // Експерим. та клінічна фізіологія і медицина. – 2001. - № 1. – С. 29-30.
15. Стефанова О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / Стефанова О. В. Київ – 2001. – 527 с.

16. Тимирбулатов Р. А. Метод повышения интенсивности СРО липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р. А. Тимирбулатов, Е. М. Селезнев // Лабораторное дело. - 1981. - № 4. - С. 209-211.
17. Філіппов Ю. О. Епідеміологічні особливості хвороб органів травлення та гастроентерологічна служба в Україні: здобутки, проблеми та шляхи їх вирішення / Ю. О. Філіппов, І. Ю. Скирда // Гастроентер. - 2005. - № 36 - С. 9-17.
18. Філіппов Ю. О. Основні показники гастроентерологічної захворюваності в Україні / Ю. О. Філіппов, І. Ю. Скирда, Л. М. Петречук // Гастроентер. - 2006. - № 37 - С. 3-9.
19. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / Чевари С. , Чабан И. , Секей Й. // Лабор. дело. - 1985. - № 11. - С. 678-681.
20. Cao Y. Purinergic modulation of respiration via medullary raphe nuclei in rats / Cao Y. , Song G. // Respir. Physiol. & Neurobiol. - 2007. - Vol. 155, № 2. - P. 114-120.
21. Juhasz A. Increasing proportion of Helicobacter pylori negative ulcers / Juhasz A. // Gut. -2001, № 49. - P. 64.
22. Lembo A. Helicobacter pylori factors associated with disease development / Lembo A. , Caradonna L. , Magrone T. // Curr. Drug Targets Immune Endocor. Metabol. Disord. - 2001. - Vol. 1, № 3. - P. 199-208.
23. Meredith P. The physical and chemical properties of eumelanin / Meredith P. , Sarna T. // Pigment Cell Res. - 2006. - Vol. 19, № 6. - P. 572-594.
24. Pearlin L. I. Stress, health, and the life course: some conceptual perspectives Pearlin L. I. , Schieman S. M. , Fazio E. M. // J. Health. Soc. Behav. - 2005. - Vol. 46, № 2. - P. 205-219.

**УДК** 57.018.34:619:615:612.176

### **ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНА НА ПОРАЖЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА КРЫС, ВЫЗВАННЫЕ МЕТОДОМ НЕРВНО-МЫШЕЧНОГО НАПРЯЖЕНИЯ ПО СЕЛЬЕ**

**Гольшкин Д. В. , Фалалеева Т. М. , Кухарский В. М. , Чижанская Н. В. , Береговая Т. В.**

**Резюме.** Меланин, продуцентом которого является дрожжеподобные грибы *Nadsoniella nigra* штамм X1, которые были высеяны из образцов вертикальных скал о. Галиндез (Украинская Антарктическая станция академик Вернадский), уменьшал язвенно-эрозивные поражения слизистой оболочки желудка, вызванных методом нервно-мышечного напряжения по Селье, в фазе напряжения. Меланин выступал стабилизатором уровня антиоксидантной защиты организма, активируя фермент антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазу), а также проявляя собственные стресс-протекторные свойства, предотвращая вредную деятельность активных форм кислорода, на что указывает восстановление уровней продуктов перекисного окисления липидов. Итак, меланин проявляет свойства стресспротектора и адаптогена и является перспективным средством профилактики и лечения последствий воздействия стресса на организм.

**Ключевые слова:** меланин, стресс, слизистая оболочка желудка, язвы, эрозии, перекисное окисление липидов, антиоксиданты.

**UDC** 018.34:619:615:612.176

### **INFLUENCE of MELANIN on the LESION in the GASTRIC MUCOSA of RATS CAUSED by NEURO-MUSCULAR TENSION by SELYE**

**Golyshkin D. V. , Falalyeyeva T. M. , Kukharsky V. M. , Chyizhanska N. V. , Beregova T. V.**

**Summary.** Melanin, produced by black yeast *Nadsoniella nigra* strain X1, which were seeded from vertical cliffs i. Halindez (Ukrainian Antarctic Station Academician Vernadsky) reduce ulcers and erosion damage of gastric mucosa caused by neuro-muscular tension by Selye, in a tension phase. Melanin appeared stabilize level of antioxidant protection the body, activate the antioxidant enzyme (Superoxide dismutase), as well as displaying their own stress protective properties by preventing vulnerable of reactive oxygen species, as shown by restored levels of lipid peroxidation products. Thus, melanin shows stress protection and adaptogenic properties and is a promising way to prevent and treat the effects of stress on the body.

**Key words:** melanin, stress, gastric mucosa, ulcers, erosions, lipid peroxidation, antioxidants.

*Стаття надійшла 4. 02. 2010 р.*