

УДК 576.311.31:(612.015.4:582.282.23):(612.063:612.33)(1-923.3)

**ПРО ЗАЛУЧЕННЯ РЕЦЕПТОРІВ АКТИВАЦІЇ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ПЕРИКСИСОМ ГАМА В МЕХАНІЗМ АНТИВИРАЗКОВОЇ ДІЇ МЕЛАНІНУ, ВИДІЛЕНОГО З АНТАРКТИЧНИХ ДЖЕРЕЛ**

**В.М. Кухарський<sup>1</sup>, Н.В. Чижанська<sup>2</sup>, О.І. Цирюк<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, проспект Академіка Глушкова, 2, корпус 12, Київ, Україна. E-mail: [vitaliy@univ.kiev.ua](mailto:vitaliy@univ.kiev.ua)*

<sup>2</sup>*Полтавська державна аграрна академія, вул. Скороди, 1/3, Полтава, Полтавська обл., 36003, Україна, E-mail: [pdaa@agroak.poltava.ua](mailto:pdaa@agroak.poltava.ua)*

**Реферат.** У гострих дослідах на 55 білих щурах досліджено один із можливих механізмів цитопротективної дії меланіну за участі рецепторів активації проліферації периксисом гама. Було встановлено, що імобілізаційний стрес у модифікації Гройсмана і Каревіної викликав у слизовій оболонці шлунка формування виразок, ерозій і крововиливів. Меланін у дозі 5 мг/кг справляв профілактичну дію на розвиток ушкоджень, викликаних стресом. Незворотній селективний антагоніст рецепторів активації проліферації периксисом гама GW9662 в дозі 1 мг/кг усував цитопротективний вплив меланіну на формування стресогенних ушкоджень. Ми дійшли висновку, що антистресова дія меланіну у слизовій оболонці шлунка у щурів повністю або частково регулюється за участі рецепторів активації проліферації периксисом гама.

**Об участии рецепторов активации пролиферации периксисом гамма в механизме антиязвенного действия меланина.** В.М. Кухарский, Н.В. Чижанская, О.И. Цирюк

**Реферат.** В острых опытах на 55 белых крысах исследован один из возможных механизмов цитопротективного действия меланина при участии рецепторов активации пролиферации периксисом гамма. Было установлено, что иммобилизационный стресс в модификации Гройсмана и Каревинной вызывал в слизистой оболочке желудка формирование язв, эрозий и кровоизлияний. Меланин в дозе 5 мг/кг оказывал профилактическое действие на развитие повреждений, вызванных стрессом. Необратимый селективный антагонист рецепторов активации пролиферации периксисом гамма GW9662 в дозе 1 мг/кг устранял цитопротективное действие меланина на формирование стрессогенных повреждений. Мы пришли к выводу, что антистрессовое действие меланина в слизистой оболочке желудка у крыс полностью или частично регулируется при участии рецепторов активации пролиферации периксисом гамма.

**The involvement of peroxisome proliferator-activated receptors gamma in antiulcer action of melanin.** V.M. Kukharsky, N.V. Chyzhanska, O.I. Tsyryuk

**Abstract.** In acute experiments on 55 white rats we investigated one of the possible mechanisms of cytoprotective action of melanin via activation of peroxisome proliferator-activated receptors gamma. It was established that immobilization stress by Groisman and Karevina evoked in gastric mucosa the formation of ulcers, erosions and hemorrhages. Melanin in dose 5 mg/kg defended gastric mucosa against development of injuries evoked by stress. Irreversible selective antagonist of peroxisome proliferator-activated receptors gamma GW9662 in dose 1 mg/kg removed the cytoprotective action of melanin on formation of stress injuries. We concluded that antistress action of melanin on gastric mucosa in rats completely or partly is governed by activation of peroxisome proliferator-activated receptors gamma.

**Key words:** melanin, stress, peroxisome proliferator-activated receptors gamma.

## 1. Вступ

В ході епідеміологічних і експериментальних досліджень переконливо показано протизапальну активність природних поліфенольних сполук, одними з представників яких є пігменти меланіни. Раніше нами було показано, що меланін значно зменшує кількість уражень у слизовій оболонці шлунка щурів, викликаних дією стресових факторів [1, 2]. У подальших дослідженнях ми з'ясували, що реалізація протекторних властивостей меланіну при стресових впливах пов'язана зі зростанням рівня оксиду азоту, якому належить важлива роль у цитопротекції [3]. В результаті пошуку можливих механізмів біологічно-активної дії різних природних поліфенольних сполук кілька груп інших дослідників [4, 5] дійшли висновку, що одним з можливих мішеней дії цих сполук можуть бути рецептори активації проліферації пероксисом гама.

Синтез та регуляція переважної кількості прозапальних цитокінів регулюється на рівні транскрипції, що призводить до посилення або призупинення запальних процесів. Рецептори активації проліферації пероксисом (PPARs) вважають однією з таких молекулярних ланок між прозапальними цитокінами і факторами транскрипції. PPARs належать до групи ядерних гормональних рецепторів, які активуються специфічними внутрішніми та зовнішніми чинниками [6]. На даний час дослідниками ідентифіковано три ізоформи цих рецепторів, що кодуються окремими генами (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  / $\delta$  і PPAR $\gamma$ ). У свою чергу, найкраще охарактеризовану ізоформу PPAR розділяють на три підтипи (PPAR $\gamma$  1,  $\gamma$  2 і  $\gamma$  3) [7]. Всі ізоформи PPAR $\gamma$  формують гетеродимерні комплекси із ретиноєвими рецепторами X (RXR), утворені комплекси приєднуються до так званих елементів відповіді на PPAR (PPRE). PPRE функціонують як центральні регулятори диференціації клітин, апоптозу, запальних реакцій та енергетичного обміну [8]. Активація PPAR $\gamma$  призводить до призупинення запальних реакцій різного походження. Такий захист стає можливим як завдяки покращенню метаболізму глюкози та зниженню інсулінорезистентності, так і зниженню рівня прозапальних цитокінів. Сигнальні шляхи включають інгібування активації NF- $\kappa$  разом із зменшенням експресії та/або активності білків AP-1, TGF- $\beta$ 1, MCP-1, ICAM-1 й iNOS [9]. Також було показано, що ліганди PPAR $\gamma$  призводять до зростання рівня оксиду азоту за рахунок посилення активності eNOS, а рівень експресії патогенної форми синтази оксиду азоту iNOS, навпаки, знижувався, що відповідає раніше отриманим нами даним з вивчення механізмів дії меланіну [3]. У зв'язку з цим метою роботи було з'ясувати можливу участь PPAR $\gamma$  в реалізації цитопротекторної дії меланіну на слизову оболонку шлунка щурів, підданих впливові стресу.

Для блокування PPAR ми використали незворотний селективний антагоніст PPAR $\gamma$  GW9662 (2-хлоро-5-нітро-N-феніл-бензамід) («Sigma», США, номер за каталогом M6191). Меланін (ПП «Чага»), який ми використали в наших дослідженнях, є продуктом життєдіяльності чорних дріжджів *Nadsoniella nigra var. hesuelica*, висіяних з вертикальних скель о. Галіндез (Українська антарктична станція Академік Вернадський).

## 2. Об'єкт і методи досліджень

Дослідження проведено в умовах гострого експерименту на 55-ти білих нелінійних щурах-самцях масою 180–200 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [10]. Ефективність антистресового впливу меланіну оцінювали за його захисною дією на ураження слизової оболонки шлунка у щурів, викликані комбінованим методом холодового стресу та імобілізаційного стресу в модифікації Гройсмана і Каревіної, названого «методом соціального стресу». Для цього щурів розділили на чотири групи числом від 11 до 16 особин. Щурам першої (контрольної) групи перед нанесенням стресу вводили перорально та внутрішньобрюшинно воду в кількості 0,5 мл. Щурам другої групи перед

нанесенням стресу вводили перорально водний розчин меланіну в дозі 5 мг/кг, об'ємом 0,5 мл та внутрішньобрюшинно воду в кількості 0,5 мл. Щурам третьої групи перед нанесенням стресу вводили перорально воду в кількості 0,5 мл та внутрішньобрюшинно розчин антагоніста GW9662 в дозі 1мг/кг в 0,5 мл води. Щурам четвертої групи перед нанесенням стресу вводили перорально водний розчин меланіну в дозі 5 мг/кг, об'ємом 0,5 мл та внутрішньобрюшинно розчин антагоніста GW9662 в дозі 1мг/кг в 0,5 мл води.

З метою отримання нейродистрофічних уражень шлунка щурів розмістили у металевих циліндричних перфорованих контейнерах з прозорим вічком навпроти голови, хвосту через невеликий отвір було виведено назовні. Після іммобілізації щурів у контейнерах їхні хвости поміщали серед брикетів з льодом та залишали в такому стані на дві години. Через дві години хвости звільняли від льоду і розміщували контейнери зі щурами в колонії вільноживучих щурів, яким створено умови для природного існування (освітлення, вода, корм). Через 24 години після початку експерименту щурів виймали з контейнерів та проводили евтаназію методом цервікальної дислокації. Після вилучення шлунка його розтинали по малій кривизні, вивертати слизовою оболонкою назовні, ретельно промивали фізіологічним розчином. Після чого за допомогою гастроскопа при транслюмінаційному освітленні досліджували стан слизової оболонки шлунка. Диференційно підраховували кількість наступних різновидів уражень слизової оболонки шлунка: 1) виразки – у вигляді глибоких округлих уражень слизової оболонки з фіброзним нальотом на дні та запальним валіком навколо неї; 2) ерозії – у вигляді тріщин слизової оболонки; 3) крововиливи – бурі або чорні плями різної форми. Розраховували загальну площу кожного виду уражень для кожного шлунка та середнє значення площі уражень для групи.

Нормальність розподілу значень оцінювали за W тестом Шапіро–Уїлксона. Оскільки наші дані виявились нормально розподіленими, ми розраховували середнє значення (M) та стандартне відхилення (SD). Порівняння вибірок проводили з використанням t-критерія Стьюдента, рівень значущості даних приймали при  $p < 0,05$ . Обробку результатів здійснювали в пакеті статистичних програм «Statistica 6».

### 3. Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що ураження слизової оболонки шлунка як результат дії стресу характерне для всіх груп щурів. У слизовій оболонці шлунка щурів першої групи, підданих дії стресу, зареєстровано значну ураженість, що проявилася в появі виразок, ерозій та крововиливів. Меланін у щурів другої групи достовірно зменшував кількість уражень. При цьому площа виразок зменшувалась на 84%, крововиливів – на 56%, довжина ерозій – на 61%. Застосування GW9662 блокатора PPAR $\gamma$  паралельно із введенням меланіну спричинило елімінування достовірних змін параметрів уражень слизової оболонки шлунка щурів у четвертій групі порівняно з контрольною (див. таблицю). Таким чином, блокатор GW9662 усував цитопротективну дію меланіну на стресові ураження слизової оболонки шлунка щурів.

Таблиця

**Порівняння дії меланіну (5 мг/кг), блокатора PPAR $\gamma$  рецепторів GW9662 (1мг/кг) та дії блокатора на фоні меланіну на виразкоутворення шлунку, M $\pm$ SD**

Група	Кількість тварин	Виразки, мм <sup>2</sup>	Ерозії, мм	Крововиливи, мм <sup>2</sup>
1. Контроль	15	4,86 $\pm$ 7,44	2,41 $\pm$ 1,61	0,5 $\pm$ 0,52
2. Меланін	16	0,78 $\pm$ 1,14*	0,94 $\pm$ 2,24***	0,22 $\pm$ 0,87*
3. GW9662	11	5,17 $\pm$ 6,84	5,13 $\pm$ 5,11##	0,53 $\pm$ 1,07
4. Меланін+GW9662	13	2,51 $\pm$ 3,55	10,35 $\pm$ 6,83###	0,76 $\pm$ 2,27

\* -  $p < 0,05$  та \*\*\* -  $p < 0,001$  – порівняно з контролем;

## -  $p < 0,01$  та ### -  $p < 0,001$  – порівняно з групою щурів, яким вводили меланін.

Аналіз літератури показує, що агоністи PPAR $\gamma$  відіграють протективну роль у шлунковому виразкоутворенні, викликаному різноманітними чинниками як хімічної, так і стресової природи. Виходячи з отриманих нами результатів, можна припустити, що протективна дія меланіну в шлунковому виразкоутворенні повністю або частково зумовлена через механізм активації PPAR $\gamma$ . Зростання рівня NO крові при використанні меланіну очевидно реалізується саме завдяки активації PPAR $\gamma$ . Залишається відкритим питання про те, чи відбувається безпосередня взаємодія меланіну з рецепторами PPAR $\gamma$ , а чи тут задіяні інші посередники.

#### 4. Висновок

Одержані дані дозволяють стверджувати, що антистресова дія меланіну на слизову оболонку шлунка у щурів повністю або частково зумовлена активацією PPAR $\gamma$ .

#### Література

1. **Чижанська Н.В., Цирюк О.І., Берегова Т.В.** Про участь оксиду азоту в цитопротективній дії меланіну на слизову оболонку шлунка // Вісник проблем біології і медицини. – 2005. – Вип.3. – С. 56–59.
  2. **Savitskiy Ya., Kimakovich V., Beregova T.** New data on the action of melanin on gastric acid secretion and gastric mucosa // Programme and Abstracts 4<sup>th</sup> Parnas Conference «Molecular Mechanisms on Cell Activation: Biological Signals and Their Target Enzymes». – Wroclaw, 2002. – P. 108.
  3. **Чижанська Н.В., Кухарський В.М., Цирюк О.І., Берегова Т.В.** Вплив меланіну на експресію епітеліальної ізоформи синтази оксиду азоту (eNOS) в слизовій оболонці шлунка щурів // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2005. – Вип.5. – С. 52–59.
  4. **Inoue H.** [Endogenous ligands for PPARs] // Nippon Rinsho. – 2005. – Vol.63, № 4. – P. 578–583.
  5. **Kim C.S., Park W.H., Park J.Y.** et al. Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells // J.Med.Food. – 2004. – Vol. 7, № 3. – P. 267–273.
  6. **Feige J.N., Gelman L., Michalik L.** et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions // Prog.Lipid Res. – 2006. – Vol. 45, № 2. – P. 120–159.
  7. **Fajas L., Auboeuf D., Raspe E.** et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene // J.Biol.Chem. – 1997. – Vol. 272, № 30. – P. 18779–18789.
  8. **Escher P., Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions // Mutat.Res. – 2000. – Vol. 448, № 2. – P. 121–138.
  9. **Michalik L., Wahli W.** Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair // J.Clin.Invest. – 2006. – Vol. 116, № 3. – P. 598–606.
- Європейська конвенція** про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей // В кн.: Мурзін О.Б. Посібник до практичних занять з фізіології людини. – Дніпропетровськ: Видавництво Дніпропетровського університету, 2004. – С. 135–148.