

УДК 57.018.34:619:615:612.176

ОСОБЛИВОСТІ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ СТРЕС-ІНДУКОВАНИХ ЕРОЗИВНО-ВИРАЗКОВИХ УРАЖЕНЬ ШЛУНКА ТА ПРОФІЛАКТИЧНОГО ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУД. В. Голишкін¹, Т. М. Фалалєєва¹, Н. В. Чижанська², Т. В. Берегова¹, Л. І. Остапченко¹¹ ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вулиця Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601. dgolyshkin@gmail.com² Полтавська державна аграрна академія, вул. Сквороди 1/3, м. Полтава, Україна, 36003

Реферат. Було вивчено вплив меланіну з дріжджоподібних грибів *Nadsoniella nigra* штаму X1 зі зразків вертикальних скель о. Галіндез (Антарктика) на особливості лейкоцитарної формули крові щурів в умовах нерво-м'язової напруженості за Сельє. Встановлено, що в результаті дії стресу в досліджуваних зразках спостерігалось збільшення відсоткового складу нейтрофілів та зменшення відсотку лімфоцитів крові щурів. Профілактичне введення меланіну відновлювало функціонування імунної системи, що підтверджувалось зменшенням відсоткового складу нейтрофілів та збільшенням відсотку лімфоцитів відповідно до групи стрес-контролю. Отримані результати свідчать про зменшення запалення під впливом досліджуваної сполуки за умов стресу.

Особенности лейкоцитарной формулы крови крыс в условиях стресс-индуцированных эрозивно-язвенных поражений желудка и профилактического введения меланина.

Д. В. Гольшкін, Т. М. Фалалеева, Н. В. Чижанская, Т. В. Береговая, Л. И. Остапченко

Реферат. Было изучено влияние меланина из дрожжеподобных грибов *Nadsoniella nigra* штамма X1 из образцов вертикальных скал о. Галиндез (Антарктика) на особенности лейкоцитарной формулы крови крыс в условиях нервно-мышечного напряжения по Селье. Установлено, что в результате действия стресса в исследуемых образцах наблюдалось увеличение процентного соотношения нейтрофилов и снижение процента лимфоцитов крови крыс. Профилактическое введение меланина восстанавливало функционирование иммунной системы, что подтверждалось уменьшением процентного соотношения нейтрофилов и повышением процента лимфоцитов в сравнении с группой стресс-контроль. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении воспаления под влиянием исследуемого соединения в условиях стресса.

White blood count of rats under stress-induced stomach lesions and the prophylactic administration of melanin

D.V.Golyshkin, T.M.Falalyeyeva, N.V.Chyzhanska, T.V.Beregova, L.I. Ostapchenko

Abstract. It was studied the influence of melanin from yeast-like fungi *Nadsoniella nigra* strain X1 from vertical cliffs on the island Galindez (Antarctica) on the features of rat white blood count under neuromuscular tension by Selye. After stress it was observed increase of the neutrophils percentage and decrease lymphocyte percent of rats blood. Prophylactic administration of melanin restored the functioning of the immune system, which was confirmed by neutrophils percent decrease and lymphocyte percentage increase according to the stress group. The results suggest attenuation of inflammation under the influence of a test compound in stress conditions.

Key words: melanin, stress ulcers, leukocytes.

1. Вступ

Імунологічну реактивність лейкоцитів крові можна охарактеризувати їхніми морфологічними особливостями, структурною організацією та функціональним станом (Федорова, 1997). За кількісно-якісною оцінкою змін лейкоцитарної формули периферійної крові формуються уявлення про адаптаційні реакції організму. Інтегральні гематологічні індекси, за основу яких взято 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 (Гомоляко та ін., 1999 ; Мустафина, 1999; Бродяк, 2006).. Отже, показники лейкоцитарної формули крові є важливими додатковими методами дослідження захворювань різної етіології, у тому числі й патології, що викликані дією стресу на організм («психосоматичні захворювання»). У медичній практиці традиційними психосоматичними захворюваннями вважають нейродерміти, бронхіальну астму, псоріаз, виразки 12-палої кишки і шлунка, тиреотоксикоз, коронарну хворобу, ревматоїдний артрит, діабет і часті простудні захворювання (Krag, 2015; Nakamura, 2015; Khalsa, 2015).

За умов дії стресу функціональні резерви організму знижуються, зменшується здатність до адаптації, і підтримання гомеостазу здійснюється завдяки значній нарузі регуляторних систем, що зумовлює пошук і впровадження адаптогенів природного походження. Серед них особливу увагу приділяють поліфенольним сполукам (Fiorentini, 2015; Terahara, 2015).

Поліфеноли – збірна назва цілого класу речовин, в який входять флавоноїди, лігніни, кумарини та інші речовини, структура яких містить фенольні групи. Сьогодні налічується більше 4000 поліфенолів, фізіологічна дія яких визначається їх молекулярною структурою. Рослинні поліфеноли – це потужні антиоксиданти, вони захищають клітини нашого організму від ушкоджуючої дії вільних радикалів і підтримують їх нормальні функції, а також сповільнюють процеси старіння (Saita, 2015). У природі існує величезна кількість різних поліфенолів. Вони є складовою частиною пігментів фруктів, ягід і вина, починаючи з темно червоного і закінчуючи синім, а також білим кольором внутрішньої частини апельсинової шкірки.

Нашу увагу привернула поліфенольна сполука меланін, продуцентом якого є мікроорганізми, висіяні з зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). Виявилось, що меланін, продуцентом якого є чорні дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X-1, найбільш ефективно захищає слизову оболонку шлунка щурів від уражень, викликаних «соціальним стресом», ніж інші меланіни (Чижанська, 2008). У зв'язку з вищезазначеним метою роботи було дослідити вплив профілактичного введення меланіну на показники лейкоцитарної формули крові у щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразкових уражень шлунка.

2. Матеріали та методи

Дослідження проводилися на 30 білих нелінійних щурах-самках масою 120 — 150 г з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Rozemond, 1986). Тварини були поділені на 3 групи по 10 тварин у кожній.

Схема експерименту була наступною:

1 група — контрольна. Тваринам за 15 хвилин перед початком досліду внутрішньошлунково (в. ш.) вводили воду об'ємом 0,5 мл на щура.

2 група — щури, яким за 15 хвилин перед моделюванням стресу в. ш. вводили воду об'ємом 0,5 мл на щура.

3 група — щури, яким за 15 хвилин перед моделюванням стресу в. ш. вводили меланін в дозі 5 мг/кг, розчинений у воді об'ємом 0,5 мл на щура.

Продуцентом меланіну, використаного в наших дослідженнях, були дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, що висіяні із зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська Антарктична станція «Академік Вернадський»). Стресові ураження викликали методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Даний метод рекомендований Державним фармакологічним центром України при проведенні доклінічних досліджень стреспротекторної дії фармакологічних засобів (Стефанова, 2001). За даною методикою щурів іммобілізували на операційному столику на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Тривалість іммобілізації складала 3 години. Через 2 години після припинення знерухомлення тварин умертвляли за допомогою цервікальної транслокації. З серцевої сумки брали кров для підготовки сироватки. Кров забирали з яремних вен. У крові здійснювали підрахунок кількості лейкоцитів за допомогою камери Горяєва. На предметному скельці готували мазок крові і фарбували за методом Романовського (Меньшиков, 1987). Різні типи лейкоцитів

визначали в 4 крайових ділянках фіксованого мазка. Підраховували 100 лейкоцитів та визначали відсотковий склад палочкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, лімфоцитів.

Одержані результати перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки наші дані виявилися нормально розподілені, порівняння вибірок проводилися за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), похибку середнього значення (m). Значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

3. Результати досліджень

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 (рис. 1), тоді як відсоток лімфоцитів знизився на 48 % ($p < 0,001$) відносно контролю (рис. 2).

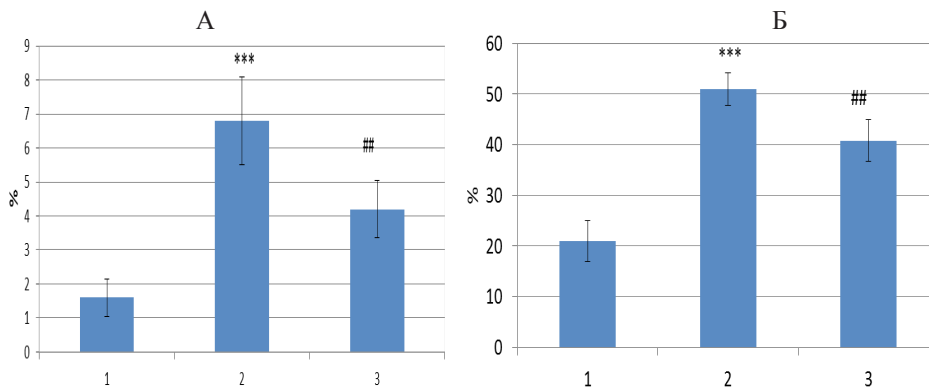


Рис. 1. Відсотковий склад палочкоядерних (А) та сегментоядерних (Б) нейтрофілів крові щурів за умов нервово-м'язового напруження за Сельє та введення меланіну (5 мг/кг): 1 – контроль (n = 10), 2 – стрес (n=10), 3 – стрес + меланін (n=10). *** – $p < 0,001$ у порівнянні з контролем, ## – $p < 0,01$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

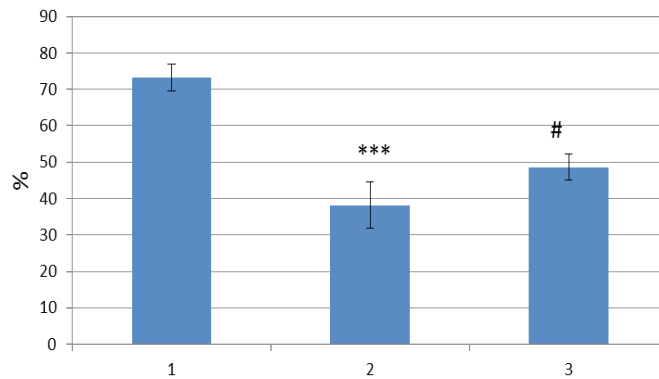


Рис. 2 Відсотковий склад лімфоцитів крові щурів за умов нервово-м'язового напруження за Сельє та введення меланіну (5 мг/кг): 1 – контроль (n=10), 2 – стрес (n=10), 3 – стрес + меланін (n=10). *** – $p < 0,001$ у порівнянні з контролем, # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою щурів, підданих дії стресу.

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 (рис. 1). Вміст лімфоцитів у групі щурів яким перед нанесенням стресу вводили меланін відновлювався на 27 % ($p < 0,05$) відносно групи стресу (рис. 2). Отримані результати свідчать про те, що профілактичне введення меланіну призводить до зменшення запальної реакції організму щурів.

4. Обговорення результатів досліджень

Дослідженнями фізіологічних і хімічних особливостей меланінових пігментів було виявлено, що полімерні молекули меланіну здатні ефективно впливати на ключові процеси клітинного метаболізму.

Крім своїх функцій регулятора процесів окиснення-відновлення, гормонального обміну, меланінам приділяється роль універсальних протекторів при впливі на клітину фізико-хімічних факторів мутагенної й канцерогенної природи. Всі ці якості роблять меланіни досить привабливими для використання їх як основних діючих субстанцій фармацевтичних препаратів. Крім того, меланіни, що найголовніше, є природними ефекторами й тому мають високу спорідненість до основних метаболічних систем клітини, у результаті чого вирішуються проблеми цілеспрямованого впливу меланіну (або комплексу меланіну з іншими речовинами) на обмінні процеси, що не зачіпають інші функціональні системи клітини.

У цьому році (2015) у «Всесвітньому журналі гастроентерології» вийшла оглядова стаття про ефективність застосування поліфенолів для лікування пептичної виразки (Farzaei, 2015). Автори зазначають, незважаючи на медичні досягнення, лікування виразкової хвороби та її ускладнень, зокрема високої летальності, залишається невирішеною проблемою. Огляд літератури підтвердив, що дієтичні поліфеноли володіють профілактичною і лікувальною дією при виразковій хворобі за рахунок цитопротективних та анти запальних властивостей.

В даній роботі досліджувався вплив водорозчинного меланіну, що синтезується дріжджоподібними грибами штаму *Nadsoniella nigra* зі зразків вертикальних скель на о. Галіндез (Антарктика). Антарктична станція розташована в ділянці озонової дери. Меланін, що виробляється мікроорганізмами, захищає їх від надмірного опромінення. Тому ми припустили, що меланін даного походження має бути більш сильним радіопротектором, антиоксидантом та ін. у порівнянні з іншими меланінами. У наших попередніх роботах було встановлено, що меланін, виділений з дріжджоподібних грибів *Nadsoniella nigra* штам X1, захищав слизову оболонку шлунка від оксидативних уражень, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє (Голишкін, 2015). Ця модель стресу є найбільш наближеною до природних умов і поєднує в собі елементи емоційного та фізичного стресу (Ader, 2001).

В іншій роботі нами досліджені антизапальні ефекти меланіну природного походження за умов стресу на *in vivo* моделях (Голишкін, 2014). Враховуючи результати наших попередніх досліджень про стресадаптогенну дію меланіну, можна зробити висновок, що вплив сполуки на лейкоцитарний профіль є одним з проявів її стресадаптогенної дії та механізмом підтримання гомеостазу слизової оболонки шлунка за умов дії стресу. Варто відзначити, що меланін — це поліфенольна сполука, тому його ефекти на цитокіновий профіль можуть бути обумовлені впливом на експресію ядерних рецепторів PPAR (Cui, 2014), участь яких у протизапальних процесах на сьогодні чітко встановлена (El-Sheikh, 2014). Дані механізми потребують подальших досліджень.

5. Висновки

1. Профілактичне введення меланіну призводить до зменшення запальної реакції організму щурів.
2. Меланін є перспективним засобом для профілактики та лікування наслідків дії стресу на організм.

Подяка. За надання зразків для проведення досліджень і підтримку висловлюємо подяку Національному антарктичному науковому центру Міністерства освіти і науки України.

Список літератури

1. **Бродяк І.**, Сибірна Н. Морфофункціональні дослідження лейкоцитів периферійної крові за умов експериментального цукрового діабету у щурів // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. — 2006. — Т. 42. — С. 117 – 127.
2. **Голишкін Д.**, Вірченко О., Фалалєєва Т. та ін. Вміст цитокінів у сироватці крові щурів за умов дії стресу та введення меланіну // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: «Біологія». — 2014. —Т. 67, № 2. — С. 69 – 73.

3. **Голишкін Д. В.**, Фалалєєва Т. М., Непорада К. С. та ін. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу // *Фізіологічний журнал*. — 2015. — Т. 61, № 2. — С. 66 – 73.
4. **Гомоляко І. В.**, Тумасова К. П. Ультроструктурна характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові у хворих на хронічний холецистит // *Вісник морфології*. — 1999. — Т. 1, № 5. — С. 6 – 8.
5. **Доклинические** исследования лекарственных средств / Стефанова О. В. — К. : Авицена, 2001. — 528 с.
6. **Меньшиков В. В.** Лабораторные методы исследования в клинике // *Справочник*. — М. : Медицина, 1987. — 124 с.
7. **Мустафина Ж. Г.**, Краморенко Ю. С., Кобцева В. Ю. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией // *Клин. лаб. диагностика*. — 1999. — № 5. — С. 47 – 49.
8. **Федорова М. З.**, Левин В. Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // *Клин. лаб. диагностика*. — 1997. — № 11. — С. 44 – 46.
9. **Чижанська Н. В.** Дослідження механізмів антистресової дії меланіну : автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03. 00. 13 / Н. В. Чижанська ; Київ. Нац. Ун. ім. Т. Шевченка. К., 2008. — 19 с.
10. **Cui Y.** et al. Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated mechanism in mice // *Nutr Res*. — 2014. — V. 34, № 3. — P. 268 – 275.
11. **El-Sheikh A. A.** Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)- gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver // *PPAR Res*. — 2014. — V. 2014. — P.1 – 10.
12. **Farzaei MH.**, Abdollahi M., Rahimi R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer // *World J Gastroenterol*. — 2015. V. 21. — P. 6499 – 517.
13. **Fiorentini D.**, Zamboni L, Vieceli Dalla Sega F et al. Polyphenols as modulators of aquaporin family in health and disease // *Oxid Med Cell Longev*. — 2015. — № 4. — P. 1–8.
14. **Khalsa DS.** Stress, meditation, and Alzheimer’s disease prevention: where the evidence stands. *J Alzheimers Dis*. — 2015. V. 48, № 1. — P.1–12.
15. **Krag M.**, Perner A., Wetterslev J. et al. Trials on stress ulcer prophylaxis: finding the balance between benefit and harm. // *Intensive Care Med*. —2015. — V. 41, № 7. — P. 1367–8.
16. **Nakamura K.** Central circuit mechanism for psychological stress-induced hyperthermia // *Brain Nerve*. — 2015. — V. 67, № 10. — P. 1205 – 14.
17. **Psychoneuroimmunology** / Ader R. — San Diego : Cohen Academic Press; —2001. — 1320 p.
18. **Rozemond H.** Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch // *Act. Vet Q*. — 1986. V. 8, № 4. — P. 346 – 9.
19. **Saita E.**, Kondo K., Momiyama Y. Anti-inflammatory diet for atherosclerosis and coronary artery disease: antioxidant foods. *Clin. Med. Insights Cardiol*. — 2015. — № 8. — P. 61–5.
20. **Terahara N.** Flavonoids in foods: a review. *Nat Prod Commun*. — 2015. V. 10, № 3. — P. 521–8.