

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЛОЗИНСЬКА ІРИНА ІГОРІВНА

УДК: 612.33.014.484/.015.113 – 019:546.222

ДИСЕРТАЦІЯ

Роль системи NO-синтаза/аргіназа за умов блокування циклооксигенази та моделювання вмісту гідрогену сульфід у слизовій оболонці тонкої кишки

03.00.04 – біохімія

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

І.І. Лозинська

Науковий керівник – **Склярів Олександр Якович**, доктор медичних наук, професор

Львів – 2018

АНОТАЦІЯ

Лозинська І.І. Роль системи NO-синтаза/аргіназа за умов блокування циклооксигенази та моделювання вмісту гідрогену сульфїду при стресї у слизовїй оболонцї тонкої кишки. – Квалїфікацїйна наукова праця на правах рукопису.

Дисертацїя на здобуття наукового ступеня кандидата біологїчних наук за спецїальнїстю 03.00.04 «біохїмїя». – Львівський нацїональний медичний унїверситет іменї Данила Галицького, Мїнїстерство охорони здоров'я України, Львів, 2018; Інститут біологїї тварин НААН, Львів, 2018

Дїя стресу та нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) є ключовими факторами розвитку деструктивних ушкоджень слизових оболонок органів травлення. У виникненнї виразкових ушкоджень провідну роль відіграють: система L-аргїнін/NO-синтаза/NO, процеси ліпопероксидацїї, зростання інфільтрацїї слизових нейтрофілами, зниження продукцїї H₂S тощо. Враховуючи широке застосування НПЗП при рїзних патологїях та їх негативний вплив на слизову оболонку органів травлення, важливим аспектом є створення та визначення дїї нових модифїкованих НПЗП.

Дисертацїйна робота присвячена дослїдженню механїзмів дїї інгїбіторів ЦОГ/ЛОГ на стан системи L-аргїнін/NO-синтаза/NO, розвиток оксидативних процесів при рїзних моделях стресу у слизовїй оболонцї тонкої кишки (СОТнК) та зниження їх ентеротоксичної дїї шляхом моделювання вмісту гїдроген сульфїду. Дослїдження були проведенї на 264 бїлих щурах. Згїдно завдань роботи було проведено 9 серїй дослїджень.

Встановлено, що дїя стресу (адреналїн-їндукований стрес (АїС) та водно-їмобїлізацїйний стрес (ВїС)) супроводжувалась морфологїчними змїнами СОТнК та активацїєю прозапальних ензимів (iNOS, мїєлопероксидази (МПО)), зростанням вмісту метаболїтів NO, процесів ПОЛ у СОТнК, зниженням концентрацїї H₂S у плазмі кровї, у клубовому вїддїлї тонкої кишки зростала кїлькїсть *Echerichia coli* та клостридїальної мїкрофлори.

Доведено, що введення тваринам різних за механізмом дії НПЗП призводить до морфологічних змін та підвищення активності iNOS, МПО, концентрації ТБК-активних продуктів, зниження активності cNOS у СОТнК та H_2S у плазмі крові, порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Встановлено, що при поєднаній дії неселективного блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацину та ВІС спостерігалось збільшення деструктивних ушкоджень СОТнК, що проявлялось порушенням цілісності слизового бар'єру, дисциркуляторними змінами в судинах слизової оболонки та підслизового прошарку; збільшенням клостридіальної мікрофлори в дванадцятипалій кишці ($p < 0,05$) та тенденцією до збільшення числа ентерококів в проксимальному та дистальному відділі тонкої кишки, у порівнянні з самостійною дією стресу. Параметри системи L-аргінін/NOS/NO за умов поєднаної дії блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 та стресу суттєво не відрізнялись від показників при самостійному впливі ВІС. Встановлено, що введення інгібіторів ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ призводило до пригнічення окисного шляху метаболізму L-аргініну, про що свідчить зниження активності iNOS та паралельне підвищення активності cNOS, аргінази у СОТнК. Концентрація $NO_2^- + NO_3^-$ знижувалась на 35 % ($p < 0,05$) за умов дії целекоксибу та на 42 % ($p < 0,05$) при дії дарбуфелону на тлі ВІС, порівняно з показниками стресу.

Встановлено, що за умов впливу різних за механізмом дії НПЗП на тлі стрес-індукованих змін вміст ТБК-активних продуктів знижувався та зростала активність СОД у СОТнК тільки за умов поєднаної дії інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі ВІС, порівняно з показниками стресу. Активність МПО при введенні целекоксибу та дарбуфелону за умов стресу знижувалась на 43 % ($p < 0,01$) та більш ніж у два рази ($p < 0,01$), відповідно, порівняно з показниками самостійного впливу ВІС.

Порівнюючи зміни параметрів системи L-аргінін/NOS/NO за умов дії напроксену та H_2S -вмісного напроксену (АТВ-346) на тлі ВІС нами не виявлено достовірних змін, що свідчить про домінування ефекту впливу базової субстанції НПЗП. При цьому було встановлено, що дія АТВ-346 на тлі стресу призводила до відновлення вмісту H_2S у плазмі крові до показників контрольної групи тварин та викликала зменшення вмісту ТБК-активних продуктів (на 19 %, $p < 0,05$), активності

МПО ($p < 0,05$) та підвищення активності СОД та каталази (на 24 %) порівняно з показниками самостійної дії ВІС та напроксену.

Встановлено, що одноразове введення похідних 4-тіазолідинону (Les-5055 та Les-5054) у дозі 10 мг/кг не викликало видимих макроскопічних змін СОТнК, однак при цьому зростала активність iNOS, активність ензимів антиоксидантної системи (СОД та каталази), підвищувався вміст NO_2^- (на 41 %, $p < 0,01$) та знижувалась активність sNOS та аргінази у СОТнК, порівняно з показниками контрольної групи тварин. Параметри системи NO-синтаза/аргіназа, концентрація ТБК-активних продуктів у СОТнК та концентрація H_2S у плазмі крові за умов дії сполуки Les-5054 були на рівні показників контрольної групи тварин.

Введення похідних 4-тіазолідинону за умов 5-годинного ВІС призводило до зниження активності iNOS, концентрації NO_2^- та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, активності МПО, вмісту ТБК-активних продуктів та підвищення активності sNOS та ферментів антиоксидантного захисту (СОД та каталази) у СОТнК; вміст H_2S у плазмі крові зростав, порівняно із показниками при впливі ВІС. Слід відзначити, що ефект дії сполуки Les-5054 був більш вираженим, ніж сполуки Les-5055.

Показаний ульцерогенний вплив неселективного блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацину (у дозі 35 мг/кг), який протягом 72 год призводив до розвитку структурно-геморагічних ушкоджень у клубовому відділі тонкої кишки. При цьому, активність iNOS зростала утричі ($p < 0,01$) та збільшувався вміст стабільних метаболітів NO у два рази ($p < 0,01$), активність sNOS знижувалась більш, ніж у 2 рази ($p < 0,01$), активність аргінази - у 4 рази ($p < 0,01$) у СОТнК, вміст L-аргініну в плазмі крові за цих умов зменшувався на 33 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. Вміст ТБК-активних продуктів за умов дії індометацина зростав, також підвищувалась активність СОД (на 16 %, $p < 0,05$) та каталази (на 32,5 %, $p < 0,05$), порівняно з показниками контролю.

Встановлено, що за умов триразового перорального введення похідних 4-тіазолідинону (у дозі 10 мг/кг) на тлі індометацин-індукованих уражень зменшувалась площа деструктивних ушкоджень у СОТнК. Застосування сполуки Les-5054 за умов НПЗП-індукованих уражень викликало зниження активності iNOS

на 35 % ($p < 0,05$) та паралельно підвищувало активність cNOS, аргінази та знижувало вміст ТБК-активних продуктів та активність МПО у СОТнК, порівняно з самотійною дією індометацину. У плазмі крові за вище вказаних умов спостерігалось підвищення концентрації L-аргініну та H_2S . Дія сполуки Les-5054 на тлі впливу індометацину була більш вираженою.

Отже, отримані результати розкривають зміни системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та стан оксидативних процесів за умов стрес- та НПЗП-індукованих ентеропатій та роль газових медіаторів (NO та H_2S) у механізмах цитопротекції у СОТнК.

Ключові слова: СОТнК, НПЗП, похідні 4-тіазолідинону, NO, H_2S , пероксисне окиснення ліпідів.

ANNOTATION

Lozynska I.I. Role of NO-synthase/arginase system on the background of cyclooxygenase inhibition and modeling of hydrogen sulfide content in stress condition in small intestinal mucosa. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a candidate of biological science degree in speciality 03.00.04 «Biochemistry». – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2018; Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, 2018

The effects of stress and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are key factors in the development of destructive lesions of the gastrointestinal mucosa. L-arginine/NO-synthase/NO system, lipid peroxidation processes, mucosal neutrophil infiltration, reduction of H_2S generation, etc play a leading role in formation of ulcerative lesions. Given the widespread use of NSAIDs in various pathologies and their negative effects on the gastrointestinal mucosa, an important aspect is the creation and detection of new modified NSAIDs effect.

The dissertation is devoted to the study of mechanisms of action of COX/LOX inhibitors on the state of the system L-arginine/NO-synthase/NO, the development of

oxidative processes in various models of stress in the small intestinal mucosa (SIM) and reduction of their enterotoxic action by modeling of hydrogen sulfide content. The studies were carried out on 264 white rats. According to the objectives of the work 9 series of studies were carried out.

It has been found that the effect of stress (epinephrine-induced stress (EIS) and water-restraint stress (WRS)) was accompanied by morphological changes in SIM and the activation of proinflammatory enzymes (iNOS, myeloperoxidase (MPO)), an increase of NO metabolites content, lipid peroxidation in SIM, decrease of plasma H₂S concentration, the number of *Echerichia coli* and clostridial microflora in the illeum was increased.

It has been proved that the administration of NSAIDs with different mechanism of action results in morphological changes and increased iNOS and MPO activity, TBA-active products concentration, decreased cNOS activity in SIM and plasma H₂S concentration as compared to control group.

It was established, an increase in destructive damage of SIM, manifested by violation of the integrity of the mucosal barrier, dyscirculatory changes in the vessels of the mucous membrane and submucosal layer on the background of the combined action of the non-selective COX-1/COX-2 inhibitor indomethacin and WRS; led to increase in clostridial microflora in the duodenum ($p < 0.05$) and a tendency to increase of the number of enterococci in the proximal and distal part of the small intestine compared with indices of stress. The parameters of the system L-arginine/NOS/NO on the background of the combined action of COX-1/COX-2 inhibitor and stress did not differ significantly with indices of WRS. It was found that administration of COX-2 and COX-2/5-LOX inhibitors leads to suppression of oxidative L-arginine metabolism evidenced by a decrease in the activity of iNOS and parallel increase in cNOS, arginase activity in SIM. The concentration of $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ decreased for 35 % ($p < 0.05$) on the background of combined action of celecoxib and stress and 42 % ($p < 0.05$) on the background of combined action of darbufelone and stress as compared with indices of stress.

It was established that influence of NSAIDs with different mechanism of action on the background of stress-induced changes decreased the content of TBA-active products

and increased the activity of SOD in SIM only on the background of combined action of the COX-2/5-LOX inhibitor and WRS as compared with indices of stress. The administration of celecoxib and darbufelone on the background of stress reduced MPO activity by 43 % ($p < 0,01$) and more than 2-fold ($p < 0,01$), respectively, compared with indices of WRS group.

Comparing L-Arginine/NOS/NO system changes in naproxen and H₂S-releasing naproxen derivative (ATB-346) pretreated rats subjected to WRS, we have not found any significant changes, indicating the dominating effect of NSAID base substance. It was found that the effect of ATB-346 on the background of stress led to the restoration of plasma H₂S content to the indices of the control group and caused a decrease in TBA-active products (for 19 %, $p < 0.05$), MPO activity ($p < 0.05$) and increase of SOD and catalase activity (for 24 %) compared to the indices of the combined action of WRS and naproxen.

It was found that the one-time administration of 4-thiazolidinone derivatives (Les-5055 and Les-5054) at a single dose 10 mg·kg⁻¹ did not cause visible macroscopic changes in the SIM, while, iNOS activity, antioxidant enzyme activities (SOD and catalase), NO₂⁻ content increased (for 41 %, $p < 0.01$) and the activity of cNOS and arginase decreased in SIM, compared with the control group values. The parameters of the NO synthase/arginase system, concentration of TBA-active products in the SIM and the plasma H₂S concentration in Les-5054-pretreated rats were at the level of the control group values.

Administration of 4-thiazolidinone derivatives on the background of WRS during 5 hours resulted in a decrease of iNOS activity, NO₂⁻ and NO₂⁻+NO₃⁻ concentration, MPO activity, the content of TBA-active products and enhancement of cNOS and antioxidant defense enzymes activity (SOD and catalase) in SIM; H₂S content in blood plasma increased as compared with indices of WRS. It should be noted that the compound Les-5054 showed more pronounced effect compared to compound Les-5055.

The ulcerogenic effect of the non-selective COX-1/COX-2 inhibitor indometacin (at a dose of 35 mg/kg) was shown, which during 72 hours led to the development of structural and hemorrhagic damages in the ileum. At the same time, the iNOS activity

increased 3 fold ($p<0.01$) and the content of NO stable metabolites increased 2 fold ($p<0.01$), cNOS activity decreased more than 2 fold ($p<0.01$), activity arginase - in 4 fold ($p<0.01$) in SIM, plasma L-arginine concentration decreased for 33 % ($p<0.01$) on the background of these conditions compared to the control group values. The content of TBA-active products increased on the background of indometacin action, and SOD (by 16 %, $p<0.05$) and catalase activity (for 32.5 %, $p<0.05$) increased as compared with control values.

It was found that the three-time intragastrically administration of 4-thiazolidinone derivatives (at a dose of 10 mg/kg) on the background of indometacin-induced lesions decreased the total area of destructive lesions in SIM. Administration of Les-5054 compound on the background of NSAID-induced lesions decreased iNOS activity by 35 % ($p<0.05$) and simultaneously increased cNOS, arginase activity and reduced TBA-active products concentration and MPO activity in SIM as compared with independent action of indometacin. L-arginine and H₂S concentration in blood plasma was increased in the above mentioned conditions. The effect of compound Les-5054 on the background of indometacin effect was more pronounced.

Consequently, the results reveal the changes of L-arginine/NO-synthase/arginase system and oxidative processes on the background of stress and NSAID-induced enteropathy conditions and the role of gas mediators (NO and H₂S) in the mechanisms of cytoprotection of SIM.

Key words: small intestinal mucosa, NSAID, 4-thiazolidinone derivatives, NO, H₂S, lipid peroxidation processes

Список публікацій здобувача

1. **Ільків І. І.**, Панасюк Н. Б., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази/ліпооксигенази у тонкій кишці. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2014. Т. 68, № 4. С. 19–25. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, брала участь у підготовці статті до друку).*

2. **Ільків І. І.**, Панасюк Н. Б., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Дія H₂S-вмісного напроксену на стан системи NO-синтаза/аргіназа за умов стресу в тонкій кишці. Медична хімія. 2014. Т. 16, № 4. С. 18–21. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, брала участь у підготовці статті до друку).*

3. Fomenko I., Bondarchuk T., Emelyanenko V., Denysenko N., Sklyarov P., **Ільків І. І.**, Lesyk R., Sklyarov A. Changes of nitric oxide system and lipid peroxidation parameters in the digestive system of rats under conditions of acute stress, and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2015. Vol. 28, No 1. P. 37–41. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, брала участь у підготовці статті до друку).*

4. Фоменко І. С., Корнійчук О. П., Гураль А. Р., Шикула Р. Г., **Ільків І. І.**, Склярів О. Я. Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі. Фізіологічний журнал. 2015. Т. 61, № 1. Р. 42–49. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, брала участь у підготовці статті до друку).*

5. **Ільків І. І.**, Lesyk R., Sklyarov O. The influence of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotective mechanisms of small intestine under NSAID-induced damage. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016. Vol. 88, Special Issue. P. 99–104.

(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала публікацію до друку).

6. **Пків І.**, Lesyk R., Sklyarov O. Evaluation of novel 4-thiazolidinone-based derivatives as possible cytoprotective agents against stress model in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2017. Vol. 7. P. 199–203. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала публікацію до друку).*

7. **Ільків І. І.**, Лесик Р. Б., Склярів О. Я. Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів: пат. 108412 Україна. № у 2016 01336; заявл. 15.02.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 12. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, провела оформлення патенту).*

8. **Ільків І. І.**, Склярів О. Я. Вплив H₂S-вміщуючого напроксена (АТВ-346) на стан NO-синтазної системи у слизовій оболонці тонкої кишки щурів за умов стресу. Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали XXXI Всеукраїнської науково-практичної конференції, (Харків, 22 травня 2014 р.). Харків: НФаУ, 2014. С.43. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

9. **Пків І. І.**, Sklyarov O. Ya. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the NO-synthase system in the mucosa of small intestine of rats under the stress. Stress: comprehensive & authentic summer school: Abstract book (21-25 July 2014). Zagreb, Croatia, 2014. P.46. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

10. Фоменко І. С., Панасюк Н. Б., Бондарчук Т. І., Денисенко Н. В., **Ільків І. І.**, Склярів П. О., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Особливості змін

активності системи NO-синтаза/аргіназа в органах травної системи за стресу та блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2/5-ЛОГ. The Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86, Special Issue. P. 117. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, брала участь у написанні тез).*

11. Fomenko I. S., Panasyuk N. B., **Ілків І. І.**, Bondarchuk T. I., Sklyarov P. A., Yemelyanenko V. Y., Denisenko N. V., Biletska L. P., Sklyarov A. Y. Peculiarities of the changes of NO-synthase/arginase system in digestive organs under the conditions of stress and COX-1/COX-2, COX-2/5-LOX blockage. The 8th symposium on cell/tissue injury and cytoprotection/organoprotection: Abstract book (24-26 September 2014). Budapest, Hungary, 2014. P.1654. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз одержаних результатів, брала участь у написанні тез).*

12. **Ілків І.**, Lesyk R., Sklyarov O. Exploiting hydrogen sulfide of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotection of small intestine under indomethacin-induced injury. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference: Abstract book (7-10 April 2016). Prague, Czech Republic, 2016. P.67. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

13. **Ілків І. І.**, Склярів О. Я. Дослідження механізмів цитопротекції похідних 4-тіазолідинону за умов стресу у тонкій кишці. Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали XXXIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Харків, 08 квітня 2016 р.). Харків: НФаУ, 2016. С.90. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

14. **Ілків І.**, Лесик Р., Склярів О. Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан NO-синтазної системи за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 у слизовій оболонці тонкої кишки щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Т. 73. С. 365. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення*

біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).

15. **Пків І.**, Lesyk R., Sklyarov O. Novel 4-thiazolidinone derivatives as cytoprotective agents against NSAID-induced injury. 24th United European Gastroenterology Week: Abstract book (17-19 October 2016). Vienna, Austria, 2016. P.A61-A62. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

16. **Пків І.**, Lesyk R., Sklyarov O. Effect of novel 4-thiazolidinone derivatives during COXs inhibition in small intestine of rats. 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry: Abstract book (18-20 September 2017). Lublin, Poland, 2017. P.21. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

17. **Пків І. І.**, Lesyk R. B., Sklyarov O. Ya. Cytoprotective effect of novel 4-thiazolidinone derivatives against stress conditions in small intestine of rats. Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки. 2017. Т. XLIX, № 1. С. 47. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	24
1.1 Біохімічні механізми реалізації впливу стресу на органи травлення.....	24
1.2 Утворення та біохімічні ефекти дії простагландинів у слизовій оболонці органів травлення.....	27
1.3 Дія різних за походженням нестероїдних протизапальних препаратів на біохімічні процеси у травній системі.....	31
1.4 Роль NO-синтазної системи у процесах цитопротекції та ульцерогенезу у слизовій оболонці органів травлення.....	36
1.5 Біохімічна роль гідрогену сульфїду у травній системі.....	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
2.1 Об'єкти та умови дослідження.....	49
2.2 Моделювання ушкоджень СОТнК.....	49
2.2.1 Модель адреналін-індукованого стресу.....	50
2.2.2 Модель водно-імобілізаційного стресу.....	50
2.2.3 Метод моделювання НПЗП-індукованих уражень СОТнК.....	50
2.3 Серії досліджень.....	51
2.4 Методика відбору тканин та одержання гомогенатів СОТнК.....	54
2.5 Гістологічні дослідження.....	55
2.6 Біохімічні методи аналізу.....	55
2.6.1 Визначення вмісту білка в гомогенатах тканин.....	55
2.6.2 Визначення активності ізоферментів NO-синтаз в гомогенатах СОТнК.....	55
2.6.3 Визначення вмісту нітрит- та нітрат-аніону в гомогенатах СОТнК.....	56

2.6.4	Визначення активності аргінази в гомогенатах СОТнК.....	56
2.6.5	Визначення активності мієлопероксидази в гомогенатах СОТнК	57
2.6.6	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів в гомогенатах СОТнК.....	57
2.6.7	Визначення активності супероксиддисмутази в гомогенатах СОТнК.....	58
2.6.8	Визначення активності каталази в гомогенатах СОТнК.....	59
2.6.9	Визначення вмісту H ₂ S в плазмі крові.....	59
2.6.10	Визначення вмісту L-аргініну в плазмі крові.....	60
2.7	Мікробіологічні методи аналізу.....	60
2.8	Статистичне опрацювання результатів досліджень.....	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ...		62
3.1	Роль газових медіаторів та ензимів антиоксидантного захисту в нормі, при патології та дії НПЗП.....	62
3.1.1	Морфологічний стан, активність системи NO-синтаза/аргіназа, ТБК-активних продуктів та активність ензимів антиоксидантного захисту у слизовій оболонці тонкої кишки за умов стресу.....	62
3.1.2	Дослідження активності NO-синтази, процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5- ЛОГ.....	71
3.1.3	Дослідження впливу НПЗП на стан NO-синтазної системи, інтенсивність процесів ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК та вміст H ₂ S в плазмі крові за умов ВІС.....	80
3.2	Вплив H ₂ S-зв'язаного НПЗП на процеси цитопротекції та стан мікрофлори в СОТнК за умов стресу.....	89

3.2.1	NO-синтазна система, зміни вмісту NO, H ₂ S та активність ензимів антиоксидантного захисту за умов дії інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2.....	89
3.2.2	Оцінка впливу H ₂ S-зв'язаного НПЗП на морфологічний стан та систему NOS/аргіназа, процеси ліпопероксидації, ензими АОЗ та мікрофлору тонкої кишки за умов стресу.....	96
3.2.3	Стан NO-синтазної системи, інтенсивність процесів ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК та вміст H ₂ S в плазмі крові за умов інгібування ЦОГ на тлі АІС.....	105
3.3	Дія похідних 4-тіазолідинону в механізмах цитопротекції СОТнК за умов стресу та НПЗП-індукованих уражень.....	113
3.3.1	Оцінка морфологічних змін, визначення ролі системи NO-синтази/аргінази, процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту в СОТнК та зміни вмісту H ₂ S у плазмі крові за умов поєднаного впливу ВІС та похідних 4-тіазолідинону.....	113
3.3.2	Морфологічний стан, NO-синтазна/аргіназна система, процеси ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК за умов поєднаної дії похідних 4-тіазолідинону та стресу.....	119
3.3.3	Дослідження активності NO-синтази, процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту за умов дії похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень.....	126
	РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	134
	ВИСНОВКИ.....	147
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	149
	ДОДАТКИ.....	174

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АІС – адреналін-індукований стрес
АФК – активні форми кисню
ВІС – водно-імобілізаційний стрес
ГГНС – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова системи
ІЛ - інтерлейкіни
КУО – колонієутворюючі одиниці
ЛОГ – ліпооксигеназа
ЛТ – лейкотрієни
ЛПС – ліпополісахариди
МПО - мієлопероксидаза
НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати
ПГ– простагландини
САС – симпато-адреналова система
СОД – супероксиддисмутаза
СОТнК – слизова оболонка тонкої кишки
ЦОГ – циклооксигеназа
СBS– цистатіонін-β-синтетаза
CSE – цистатіонін-γ-ліаза
EP – рецептори для ПГЕ₂
H₂S – гідрогену сульфід
ICAM-1 – молекула міжклітинної адгезії
MAPK – мітоген активуюча протеїнкіназа
3-MST – 3-меркаптопіруватсульфотрансфераза
NF-κB– ядерний фактор каппа-B
NO – нітрогену оксид
NOS – NO-синтаза
iNOS – індукцибельна NO-синтаза

cNOS – конститутивна NO-синтаза

TNF- α – фактор некрозу пухлини-альфа

ONOO⁻ – пероксинітрит

VEGF – фактор росту ендотелію судин

ВСТУП

Актуальність теми. Серед чинників, які відіграють ключову роль у розвитку деструктивних ушкоджень органів травної системи, відзначають вплив психоемоційного стресу та застосування нестероїдних протизапальних препаратів [14, 158, 196]. Незважаючи на те, що питанню розвитку НПЗП-індукованих ентеропатій приділяється суттєва увага, механізм їх виникнення вивчений недостатньо.

Механізм ульцерогенної дії неселективних блокаторів циклооксигенази (ЦОГ) пов'язують із пригніченням синтезу цитопротекторних простагландинів, окрім цього, за умов прозапальних процесів зростає активність 5-ліпооксигенази (5-ЛОГ), що вимагає оцінки впливу різних за механізмом дії блокаторів ЦОГ/ЛОГ [159, 228].

Зміни активності NO-синтазної системи та оксидативних процесів лежать у механізмах розвитку деструктивних ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки [151, 171, 186]. У механізмах цитопротекції органів травної системи бере участь H_2S , впливаючи на процеси мікрогемодинаміки, секреції, мікробіоценозу та регулюючи міжклітинну комунікацію [128, 210, 244].

Із огляду на це, важливим питанням є визначення патохімічних шляхів НПЗП-індукованих ентеропатій і пошук нових підходів щодо зниження цитотоксичності інгібіторів ЦОГ. Одним з напрямків зниження негативної дії нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) є створення на їх основі модифікованих засобів шляхом включення до структури НПЗП нітрогену оксиду (NO) або гідрогену сульфідну [11, 134, 225, 244].

Ще одним чинником розвитку структурно-геморагічних ушкоджень у слизових оболонках органів травлення є стрес, механізм дії якого пов'язаний з розвитком вазоконстрикції, виникненням гіпоксії та активацією нітрато-оксидативних процесів [37, 80, 95]. Під впливом стресу у слизовій оболонці тонкої кишки (СОТнК) зростають рівень прозапальних цитокінів і продукція простагландину E_2 за рахунок активації ЦОГ-2, змінюється вміст

нейротрансмітерів, газових медіаторів та їх метаболітів [83, 198, 236]. Недостатньо вивчено роль газових медіаторів (NO, H₂S) у механізмах цитопротекції та їх взаємозв'язок із про-/антиоксидантною системою за умов самостійної дії різних за механізмом впливу інгібіторів ЦОГ/ЛОГ, а також поєднаний їх вплив на тлі стресу та НПЗП-індукованих уражень у СОТнК.

Зв'язок теми з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексної теми кафедри біохімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького 06.00.001.15 «Дослідження ролі газових медіаторів у процесах цито- та органопротекції та оцінка дії нових протипухлинних препаратів» (№ ДР 0115U000040). Дисертант дослідила стан NO-синтазної системи, активність ензимів антиоксидантного захисту, рівень процесів ліпопероксидації у СОТнК і рівень L-аргініну, гідрогену сульфідру (H₂S) у плазмі крові щурів за умов дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на тлі стресу та НПЗП-індукованих уражень.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати вплив інгібіторів циклооксигенази/ліпооксигенази на систему L-аргінін/NOS/NO, розвиток оксидативних процесів при різних моделях стресу в слизовій оболонці тонкої кишки і зниження їх ентеротоксичної дії шляхом моделювання вмісту гідроген сульфідру.

Завдання досліджень були наступними:

1. Дослідити морфологічні зміни та параметри системи NO-синтаза/аргіназа, інтенсивність процесів ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту, мієлопероксидази у СОТнК та концентрацію H₂S у плазмі крові за умов адреналін-індукованого (AIC) та водно-іммобілізаційного стресу (BIC).

2. З'ясувати зміни NO-синтазної системи, активність мієлопероксидази, ензимів антиоксидантного захисту, оксидативних процесів у СОТнК і концентрацію H₂S у плазмі крові за умов впливу різних за механізмом дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ.

3. Вивчити особливості морфологічних змін та стан мікробіоценозу, визначити рівень нітрузо-оксидативних процесів, активність ензимів

антиоксидантного захисту у СОТнК та концентрацію H_2S у плазмі крові за умов поєднаної дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ та стресу.

4. Визначити морфологічні зміни та параметри NO-синтазної системи, ступінь вільнорадикальних процесів та активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК і концентрацію H_2S у плазмі крові за умов поєднаної дії H_2S -зв'язаного напроксену та стресу різного генезу.

5. Оцінити вплив похідних 4-тіазолідинону, як потенційних донорів H_2S , на рівень нітрузо-оксидативних процесів та активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК тварин за умов НПЗП-індукованих уражень та дії стресу.

Об'єкт дослідження – стан системи NO-синтаза/аргіназа та моделювання вмісту гідрогену сульфід у СОТнК за умов впливу стресу, інгібіторів ЦОГ/ЛОГ та їх поєднаної дії.

Предмет дослідження – параметри NO-синтазної системи, процеси ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту, мієлопероксидази (МПО) і стан мікробіоценозу тонкої кишки за умов впливу стресу різного генезу, НПЗП та сірковмісних похідних 4-тіазолідинону.

Методи дослідження. У роботі використано біохімічні методи визначення активності ізоформ NO-синтази, аргінази, супероксиддисмутази (СОД) та каталази, МПО, концентрації NO_2^- та суми $NO_2^- + NO_3^-$, ТБК-активних продуктів у гомогенатах СОТнК; концентрації L-аргініну та H_2S у плазмі крові, морфологічні (макроскопічний, гістологічний, морфометричний), мікробіологічний (культуральний метод) і статистичні методи аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Визначені зміни нітрузо-оксидативних процесів та про- та антиоксидантний стан у СОТнК за умов стресу, блокування циклооксигенази, їх поєднаного впливу та дії модифікованих H_2S -вивільняючих НПЗП. Доведено, що дія стресу (ВІС та АІС) на СОТнК призводила до порушення цілісності слизового бар'єру, набряку, що супроводжувалось активацією нітрузо-оксидативних процесів, зниженням активності аргінази та вмісту L-аргініну й H_2S у плазмі крові.

З'ясовано, що блокування ЦОГ індометацином спричиняло деструктивні ураження дистального відділу тонкої кишки, тоді як блокування ЦОГ-2 целекоксибом та ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT не призводило до розвитку макроскопічних морфологічних змін у СОТнК. Різні за механізмом дії НПЗП неоднаковою мірою викликали зростання активності іNOS, МПО, процесів ліпопероксидації, вмісту нітритів і нітратів, при одночасному зменшенні активності сNOS та аргінази у СОТнК та вмісту L-аргініну та H₂S у плазмі крові. Вперше показані морфологічні зміни й активність нітрузо-оксидативних процесів у СОТнК за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ за умов ВІС.

Визначено, що в разі застосування модифікованого напроксену (напроксен+H₂S, АТВ-346) зменшувалися деструктивні ушкодження, знижувалися активність іNOS, МПО, вмісту ТБК-активних продуктів, нітрит аніону в СОТнК та підвищувалася концентрація H₂S у плазмі крові порівняно з впливом напроксену, що свідчить про цитопротекторний вплив H₂S. Уперше показані зміни нітрузо-оксидативних процесів за умов дії АТВ-346 на тлі АІС.

Уперше визначено дію похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-5055 та Les-5054) на морфологічний стан, зміни системи NO-синтаза/аргіназа, про- та антиоксидантні процеси в СОТнК і вміст H₂S у плазмі крові. Вперше доведено, що сполука Les-5054 викликала підвищення концентрації H₂S у плазмі крові й активність ензимів антиоксидантної системи (СОД, каталази), що свідчить про знижений ентеротоксичний її вплив на СОТнК.

Практичне значення одержаних результатів. Результати, отримані за умов дії НПЗП на тлі стресу, слід враховувати при лікуванні різних патологій у практичній медицині. Отриманий патент України на корисну модель № 108412 «Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів» може бути використаний для тестування нових НПЗП у преклінічних дослідженнях.

Результати досліджень впроваджені у навчальний процес на кафедрах біохімії Національного фармацевтичного університету, Київського національного медичного університету імені О.О. Богомольця, кафедрі медичної, біоорганічної та

біологічної хімії ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», кафедри біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведений патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури, визначені методи дослідження та реалізовано виконання експериментальної частини. Дисертантом проведена статистична обробка даних та інтерпретація результатів у вигляді статей і тез доповідей під керівництвом наукового керівника д. мед. н., проф. Склярова О. Я.

Гістологічний і морфометричний аналіз змін СОТнК був проведений спільно з проф. кафедри гістології, цитології та ембріології ЛНМУ імені Данила Галицького д. мед. н. Яценко А. М. Мікробіологічні дослідження здійснено разом із завідувачем кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького д. мед. н., проф. Корнійчук О. П. Автор також висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу у проведенні досліджень, участь яких у виконанні роботи зафіксована у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на вітчизняних і міжнародних конференціях: «Stress: comprehensive & authentic summer school» (Zagreb, Croatia, 21-25 July 2014), XXXI Всеукраїнська науково-практична конференція «Ліки—людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, Україна, 22 травня 2014), The 8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Budapest, Hungary, 24-26 September 2014), XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, Україна, 24-26 травня 2015), Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference (Prague, Czech Republic, 7-10 April 2016), International scientific conference «Current problems of modern biochemistry», dedicated to the 100th anniversary of professor Borys Fedorovych Sukhomlynov (Львів, Україна, 16-18 November 2016), XXXIII Всеукраїнська науково-практична конференція «Ліки—людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, Україна, 08 квітня 2016), 24th United European Gastroenterology Week (Vienna, Austria, 17-19 October 2016), Конференція Львівського відділення

Українського біохімічного товариства і біохімічної комісії НТШ (Львів, Україна, 2017), 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Люблін, Польща, 18-20 September 2017), #SMARTLION2017 1st Sumposium Medicine UpDate (Львів, Україна, 5-6 жовтня 2017).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковані в 17 наукових працях, із них 6 статей у фахових виданнях, у тому числі 4, що входять до наукометричної бази Scopus, 10 тез доповідей наукових конференцій, 1 патент України на корисну модель,

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 183 сторінках тексту (з них 147 сторінок основного змісту), складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури (255 найменувань, із яких 39 кирилицею і 216 латиницею) та 4 додатків. Робота містить 20 таблиць та 44 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні механізми реалізації впливу стресу на органи травлення

На сьогоднішній день патології органів травлення у структурі поширеності хвороб серед населення України займають третє місце. Серед них, виразка шлунка та дванадцятипалої кишки є одним із найпоширеніших захворювань і виявляється у 20 % населення [7]. Серед основних факторів ризику, що відіграє провідну роль у розвитку патологій органів травлення у людей виділяють психоемоційний стрес. Саме частота стресу, як фактора ризику виразкової хвороби дванадцятипалої кишки складає 95,6 %, тоді як інші фактори відіграють значно меншу роль [26].

Стрес-система – це регуляторна система, яка представлена трьома ланками: нервовою, ендокринною та імунною, дія яких скерована на підтримання гомеостазу організму [222]. Стан, що виникає у відповідь на дію несприятливих факторів (фізичних або психологічних), які порушують гомеостаз організму, вперше описав канадський вчений Ганс Сельє у 1936 році і охарактеризував його як “загальний адаптаційний синдром”, що супроводжується активацією стрес-реалізуючих систем: гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи (ГГНС) та симпато-адреналової системи (САС) [83]. В результаті обробки ендо- або екзогенних сигналів в паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса виділяється кортикотропін-релізінг-фактор (КРФ), який активує ГГНС та призводить до виділення гіпофізарних пептидів, в першу чергу адренкортикотропного гормону (АКТГ), ендорфінів і енкефалінів. АКТГ викликає вивільнення глюкокортикоїдів з кори надниркових залоз. Активація симпатичної нервової системи під впливом КРФ, призводить до вивільнення адреналіну шляхом іннервації зони блакитної плями. Кортизол – первинний ефектор активації ГГНС, який регулює широкий спектр фізіологічних процесів – метаболізм вуглеводів, ліпідів, білків та спрямований на збереження енергії організмом.

Катехоламіни, що вивільняються у відповідь на активацію САС, спільно з вегетативною нервовою системою спричиняють регуляторний ефект щодо серцево-судинної, імунної системи, легенів, печінки та скелетних м'язів. Тривала або неодноразова активація ГГНС та САС систем може порушувати їх дію щодо інших фізіологічних систем, що призводить до підвищеного ризику психосоматичних розладів [23, 139, 155, 222].

Механізм розвитку ульцерогенної дії стресу в органах травної системи пов'язаний із збільшенням продукції наднирниками стрес-гормонів, головним чином катехоламінів, які шляхом впливу на α -адренорецептори призводять до вазоконстрикції, порушення кровопостачання тканин та індукують розвиток нітрузо-оксидативних процесів [43, 78]. Зростання рівня кортизолу в присутності адреналіну призводить до розвитку виразкових ушкоджень, шляхом інгібування фосфоліпази A_2 та пригнічення утворення простагландинів [218].

Окрім активації ГГНС і підвищення продукції катехоламінів при стресі також спостерігається збільшення вироблення цитокінів. У той час як катехоламіни стимулюють вироблення прозапальних цитокінів, глюкокортикоїди, як відомо, інгібують їх продукцію. Механізм розвитку дисфункції клітини за умов стресу полягає в індукції запальної реакції з одночасним зниженням протизапальної відповіді, що призводить до підвищення вивільнення цитокінів і активації макрофагально-моноцитарної ланки імунітету [72, 202, 209]. Ці зміни пов'язані з активацією транскрипційного фактора NF- κ B. Його індукція частково залежить від взаємодії норадреналіну з α_1 - та β -адренорецепторами. Механізм дії норадреналіну включає залучення мембранного G-білка, який індукує PI3-кіназу та Ras/Raf сигнальний шлях та призводить до активації мітоген-активуючої протеїнкінази (МАРК) з подальшою індукцією транскрипційного фактора NF- κ B [42, 155]. Останній збільшує експресію генів багатьох цитокінів, ферментів і молекул адгезії, які беруть участь у розвитку запальних процесів органів травної системи, у тому числі запальних захворювань кишки, за участю фактора NF- κ B, що транскрипційно регулює дію IL-1, фактор некрозу пухлини (TNF- α), IL-2, IL-6, IL-8 та IL-12,

індуцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), експресія якої збільшується при запальних процесах [217].

Захисний бар'єр слизової оболонки органів травлення у людей, підлягає впливу різних ульцерогенних чинників – гідрохлоридної кислоти, що виділяється парієтальними клітинами шлунка, лікарських препаратів, етанолу та ксенобіотиків, що потрапляють з їжею та токсинів мікроорганізмів, представлений системою, що включає шар слизу, властивості клітинних мембран, швидку реституцію епітеліальних клітин, секрецію бікарбонатів клітинами слизової оболонки, трофічним впливом нейрогуморальних факторів та місцевих біорегуляторів (простагландинів, лейкотрієнів, гормонів місцевої дії тощо). Проникність слизової оболонки тонкої кишки може регулюватись у відповідь на позаклітинні агенти, такі як цитокіни, бактерії і призводити до дисфункціонування епітелію та може сприяти розвитку запальних процесів. Стресовий фактор впливає на кишковий епітелій, збільшуючи проникність слизової оболонки кишки, в результаті чого бар'єрна функція кишки знижується [220, 231].

Муцин – основний компонент слизу, який секретується келихоподібними клітинами кишки, він складається з низки бічних вуглеводних ланцюгів - N-ацетилгалактозамін, N-ацетилглюкозамін, галактози, сіалової кислоти, що з'єднуються з молекулою білка [69, 166, 173, 223]. Наявність сіалових кислот і складних ефірів сульфату робить слиз більш в'язким і менш сприятливим до бактеріального впливу [68, 126, 232].

Низкою досліджень було показано, що вплив стресу призводить до суттєвого зменшення виробництва муцину та кислотних мукополісахаридів у слизовій оболонці кишки [69]. Так, як муцин і кислі мукополісахариди мають важливе значення для інгібування адгезії патогенної флори до слизової оболонки кишки, їх зменшення сприяє колонізації патогенних мікроорганізмів. Дія стресу призводить до зниження синтезу імуноглобуліну А (IgA), який відіграє важливу роль в захисті проти патогенних мікроорганізмів, шляхом пригнічення адгезії бактерій і сприяючи їх виведенню з ШКТ; будь-яке зниження секреції IgA,

швидше за все, збільшить колонізацію патогенних мікроорганізмів [56, 57, 147, 149, 150].

Дія стресу викликає інгібування секреції хлоридної кислоти в шлунку, зниження кількості лактобактерій у порожнині органів травлення, зміну моторики та збільшення продукції бікарбонатів в 12-палій кишці [85, 133, 148]. Зростання в системному кровоплину норадреналіну призводить до підвищення кількості грамнегативних бактерій (переважно *Escherichia coli*) в органах травлення [66, 231].

Отже, стрес впливає на різні функції органів травлення – секрецію, моторику, проникність та стан слизового бар'єра, вісцеральну чутливість, мікрогемодинаміку та мікробіоценоз [38, 220, 231].

1.2. Утворення та біохімічні ефекти дії простагландинів у слизовій оболонці органів травлення

Серед біологічно активних речовин місцевої дії значну роль відіграють простагландини (ПГ) – група біологічно активних речовин ліпідної природи, які утворюються в процесі метаболізму арахідонової кислоти. Під впливом різноманітних фізіологічних або патологічних чинників відбувається гідроліз фосфоліпідів плазматичної мембрани клітини під дією фосфоліпази A_2 із вивільненням арахідонової кислоти, яка в подальшому метаболізується одним із 3 основних шляхів: циклооксигеназним, ліпооксигеназним або цитохром P-450 монооксигеназним шляхом [73].

Ключовий шлях метаболізму арахідонової кислоти пов'язаний з участю циклооксигенази, яка являє собою біфункціональний гемопротейн зв'язаний з клітинною мембраною та локалізований в ендоплазматичному ретикулумі. Розрізняють три ізоформи циклооксигенази (ЦОГ) або простагландин G/H синтази (PGHS), що присутні в організмах вищих тварин та людини: циклооксигеназа-1 (ЦОГ-1), циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) та циклооксигеназа-3 (ЦОГ-3). ЦОГ-1 – конститутивний фермент, який експресується в більшості тканин, в тому числі

органах травної системи. Ген ЦОГ-1, *Ptgs-1*, який кодує 2.8 kb мРНК є відносно стабільний, на відміну від гену ЦОГ-2, *Ptgs-2*, який активується за допомогою широкого спектра запальних та проліферативних стимулів. ЦОГ-3 утворюється з гена ЦОГ-1, проте зберігає інтрон 1 в мРНК та експресується в корі головного мозку та серці [62, 205, 216].

Встановлено, що експресія мРНК обох ЦОГ відрізняється в різних тканинах та було зафіксовано однаковий рівень експресії мРНК як ЦОГ-1, так і ЦОГ-2 у шлунку, тонкій кишці, молочних залозах та матці, тоді як в легенях відзначається високий рівень ЦОГ-2, а рівень мРНК ЦОГ-1 був приблизно в 2 рази нижчим.

Різниця експресії генів двох ізоформ ЦОГ пояснює, що ЦОГ-1 забезпечує синтез різних видів ПГ, які необхідні для підтримки гомеостазу організму, в тому числі цитопротекції органів травної системи і гемостазу, тоді як ЦОГ-2 відіграє провідну роль в продукції ПГ (переважно ПГЕ₂) при патофізіологічних станах, оскільки індукується індуцибельна ЦОГ медіаторами запалення – ліпополісахаридами, інтерлейкіном-1, фактором некрозу пухлини-альфа (TNF- α). Дослідження третинної структури продемонструвало, що амінокислотний склад ЦОГ-1 і ЦОГ-2 в каталітичній ділянці відрізняється, зокрема відзначається заміна Le в ЦОГ-1 на Val в ЦОГ-2 в положеннях 434 і 523 [210].

ЦОГ каталізує дві реакції синтезу простагландинів та утворення циклічних ендопероксидів. Циклооксигеназа каталізує включення двох молекул кисню до складу арахідонової кислоти з утворенням 15-гідроперокси-9,11-ендопероксиду (ПГG₂), а пероксидаза відновлює цей проміжний продукт до гідрокси-ендопероксиду ПГH₂, який в подальшому під впливом специфічних PG-синтаз метаболізується до ПГЕ₂, ПГD₂, ПГF_{2 α} , ПГI₂, тромбоксану A₂ (ТХA₂). Після синтезу, простагландини виходять за межі клітини, потрапляють у міжклітинний простір і взаємодіють із рецепторами суміжних клітин, здійснюючи свою біологічну функцію. Рецептори простагландинів належать до типу родопсин-подібних рецепторів та характеризуються наявністю семи трансмембранних доменів з'єднаних з різними субодиницями G-білків [213].

Серед різних ПГ, які виробляються в організмі людини, PGE₂ вважається одним з найбільш важливим для підтримання фізіологічних функцій органів травлення, включаючи захист слизової оболонки шлунка, а також бере участь в патології різних захворювань травної системи. ПГЕ-синтаза (PGES) – фермент який каталізує ізомеризацію ПГН₂ з утворенням ПГЕ₂. На сьогодні доведено, що фермент існує в 3 формах: ЦОГ-1 селективний cPGES, ЦОГ-2 селективний mPGES-1 та mPGES-2, який не є селективним для обох ЦОГ. Експресія mPGES-1 зростає за участі прозапальних чинників та інгібується за участі глюкокортикоїдів або шляхом пригнічення активності ЦОГ-2, тоді як цитозольна форма cPGES постійно експресується в клітинах. cPGES разом з Hsp90, перетворює ПГН₂, одержаний шляхом активації цитозольної фосфоліпази А₂ та ЦОГ-1, до ПГЕ₂.

Клітинні мембранні рецептори для ПГЕ₂ поділяються на чотири різні підтипи, а саме EP₁, EP₂, EP₃ і EP₄. Всі підтипи EP рецепторів локалізуються на плазматичній мембрані; проте EP₃ і EP₄ також знаходяться на нуклеолеммі. Структурні, фармакологічні та функціональні відмінності між підтипами EP рецепторів визначають біологічну дію ПГЕ₂. Активація EP₁ та EP₂ рецепторів потребує великої концентрації ПГЕ₂ для запуску біохімічних процесів, тоді як EP₃ і EP₄ рецептори мають більшу спорідненість до ПГЕ₂ [153, 249].

Дослідження локалізації EP рецепторів, встановило наявність EP₁ в шурів в головних клітинах шлункових залоз, які виділяють пепсиноген, парієтальних клітинах, що виділяють гідрохлоридну кислоту та епітеліальних клітинах. EP₃ рецептори локалізовані в м'язовій тканині кишки шурів, тоді як в шлунку експресія EP₃ мРНК спостерігається в слизовій оболонці, особливо в парієтальних клітинах.

Ендогенні ПГ беруть участь в регуляції різних процесів в органах травної системи та виявляють протекторну дію. Так, ПГЕ₂ підвищує секрецію слизу та HCO₃⁻ за участю EP₄ рецепторів та інгібує секрецію кислоти та моторику шлунка діючи на EP₃ або EP₁ рецептори, відповідно [123]. Інгібуючий ефект ПГЕ₂ на секрецію кислоти опосередкований двома шляхами: за участю рецепторів EP₃, безпосередньо шляхом інгібування секреції кислоти у парієтальних клітинах та

опосередковано інгібуванням вивільнення гістаміну ентерохромафінноподібними клітинами (ECL) [77]. Було встановлено, що стимулюючий ефект PGE_2 на секрецію кислоти опосередковано EP_4 рецепторами шляхом збільшення виділення гістаміну з клітин ECL. Покращення кровоплину в слизовій оболонці шлунка відзначалось за умов введення агоністів EP_2 , EP_3 та EP_4 , окрім EP_1 [229].

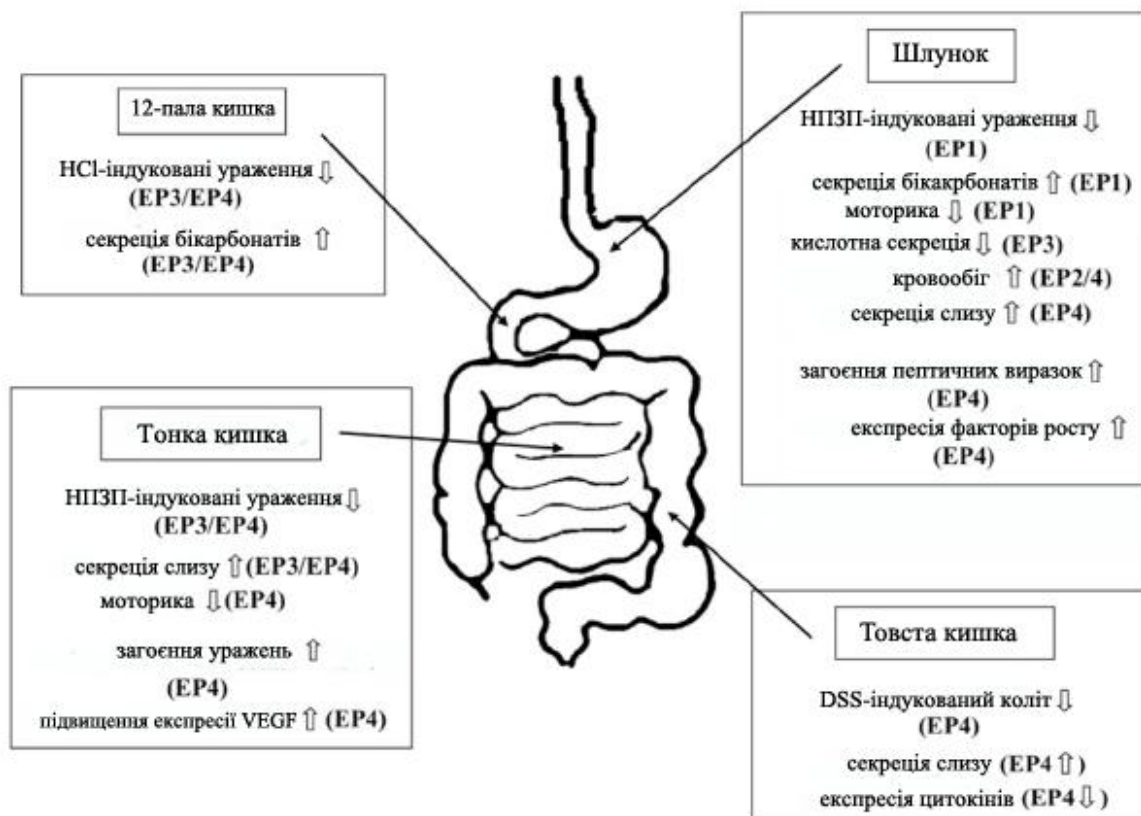


Рис. 1.1. Роль EP-рецепторів у механізмі протекторної дії PGE_2 в органах травної системи [228]

В дванадцятипалій кишці PGE_2 стимулює секрецію HCO_3^- та захищає слизовий епітелій від HCl -індукованих виразкових уражень. Крім того, було показано, що ЦОГ-1 є ключовим ферментом для регулювання кислотно-викликаної HCO_3^- секреції та підтримки цілісності слизової оболонки проти впливу гідрохлоридної кислоти в дванадцятипалій кишці [201].

З'єднання PGE_2 з EP рецептором може відігравати вирішальну роль у підтримці гомеостазу або у розвитку запальної реакції в органах травної системи. Результати досліджень показують, що сигнальний шлях PGE_2 за участю EP

рецепторів може визначати прозапальний чи протизапальний вплив. Наприклад, нещодавні дослідження *in vitro* на різних лініях епітеліальних клітин товстої кишки демонструють, що з'єднання PGE₂ з високоафінними рецепторами EP4 призводило до підвищення внутрішньоклітинного рівня цАМФ і підвищувало експресію IL-8 мРНК шляхом активації протеїнкінази А. IL-8 є сильним хемокіном, який може активувати нейтрофіли та сприяти загостренню запалення в органах травлення [74].

1.3. Дія різних за походженням нестероїдних протизапальних препаратів на біохімічні процеси у травній системі

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) є найбільш широко використовуваними лікарськими препаратами, що свідчить про їх ефективність як анальгетичних, протизапальних та жарознижувальних засобів. На сьогоднішній день НПЗП приймають щоденно понад 30 млн осіб, з них 40-60% становлять люди похилого віку [33]. Проте увага багатьох дослідників направлена на вивчення механізмів розвитку побічної дії цих препаратів в органах травної системи [92]. В залежності від інгібування ізоформ ЦОГ розрізняють неселективні інгібітори ЦОГ-1/ЦОГ-2 (індометацин, диклофенак, тощо) та селективні блокатори ЦОГ-2 (целекоксиб, рофекоксиб).

Патогенез НПЗП-індукованих ушкоджень органів травлення є складним і включає в себе як простагландин-залежні, так і простагландин-незалежні механізми. Пригнічення синтезу ПГ, обумовлене інгібуванням ЦОГ вважається найважливішим чинником у патогенезі НПЗП-індукованих гастроінтестинальних уражень. Цитотоксичний вплив НПЗП донедавна пов'язували із пригніченням саме ЦОГ-1, проте ряд досліджень встановили, що блокування обох ізоформ ЦОГ відіграє ключову роль у розвитку ентеропатії та свідчить про роль ЦОГ-2, а також ЦОГ-1 у підтримці цілісності слизової оболонки органів травної системи.

Кишкову гіпермоторику розглядають як один із патогенних чинників при НПЗП-індукованих ураженнях тонкої кишки. Індометацин, SC-560 (селективний інгібітор ЦОГ-1) помітно посилювали моторику кишки, тоді як введення рофекоксибу не впливало на перистальтику кишки. Також було встановлено, що індометацин викликав гіпермоторику шлунка та зумовлював порушення мікроциркуляції, що передувало розвитку шлункових уражень. У роботах Takeuchi [123, 228, 229] показано, що простагландини, які виявляють спорідненість до рецепторів EP_1 , інгібують моторику шлунка та запобігають виникненню індометацин-індукованих уражень.

Введення індометацину викликає геморагічні ураження в тонкій кишці, переважно в порожній та клубовій, що супроводжувалося ентеробактеріальним дисбактеріозом. Застосування $dmPGE_2$, стабільного аналога PGE_2 запобігало розвитку індометацин-індукованих уражень у тонкій кишці. Цей вплив $dmPGE_2$ імітується дією $ONO-NT-012$ (агоніст EP_3) і $ONO-AE1-329$ (агоніст EP_4), тоді як 17-феніл PGE_2 (EP_1 агоніст) або бутапрост (EP_2 агоніст) не проявляли активності. Останнє засвідчує, що цитопротекторний ефект PGE_2 в тонкій кишці щодо НПЗП-індукованої ентеропатії опосередковується активацією рецепторів EP_3 і EP_4 [228].

Інгібування ЦОГ-1 за умов дії НПЗП призводить до порушення продукції ПГ, відповідальних за синтез слизу в органах травлення. Оскільки слиз відіграє вирішальну роль у захисті організму від патогенних чинників, зменшення секреції слизу може послабити кишковий бар'єр, що призведе до бактеріальної інвазії. Іншими дослідженнями показано, що локсопрофен знижує експресію мРНК *Muc2* в тонкій кишці [144].

НПЗП-індуковані ураження органів травної системи, пов'язана частково, із впливом цих препаратів на тромбоцити. Тромбоцити секретують тромбоксан A_2 , який стимулює агрегацію тромбоцитів та виступає потужним вазоконстриктором. Вивільнення тромбоксану відбувається під час процесу згортання крові і його синтез відбувається за участі ЦОГ-1. НПЗП, що інгібують ЦОГ-1, можуть пригнічувати синтез тромбоксану тромбоцитами і тим самим зменшувало їх

агрегацію. Таким чином, знижена гастротоксичність селективних інгібіторів ЦОГ-2 може бути частково обумовлена відсутністю їх інгібуючого впливу на агрегацію тромбоцитів і, як наслідок, зниження ризику розвитку кровотечі.

Іншими дослідженнями було встановлено, що порушення загоєння виразок частково обумовлене дією НПЗП на тромбоцити. Важливий ефект тромбоцитів у процесі загоєння виразки, пов'язаний з вивільненням фактора росту ендотелію судин (VEGF), що є потужним стимулом ангіогенезу та суттєвим елементом у процесі загоєння виразки. Введення щурам як селективних, так і неселективних НПЗП призводить до суттєвого зміщення балансу між про- та антиангіогенними факторами сироватки крові (зокрема, зменшення VEGF і збільшення ендостатину). Зміна ангіогенного балансу відзначалась в експериментах на культурі ендотеліальних клітин, що підлягали впливу сироватки крові щурів та отримували селективний або неселективний інгібітор ЦОГ. В обох випадках спостерігалось зменшення проліферації ендотеліальних клітин та збільшення апоптозу. Ці ефекти *in vitro* співзвучні зі спостереженнями *in vivo* щодо значного зниження ангіогенезу в ділянці виразки щурів, які отримували НПЗП та узгоджуються з дослідженнями у яких показано, що простагландини синтезовані ЦОГ-2, стимулюють виділення VEGF з шлункових фібробластів.

Деякі НПЗП, особливо ті, що є слабкими органічними кислотами, викликають пошкодження епітелію в місцях контакту зі слизовою оболонкою шлунка. У шлунковому соці препарат перебуває в неіонізованому стані, здатний до неіонної дифузії у клітини слизової оболонки. У внутрішньоклітинному середовищі відбувається повторна іонізація препарату, що може призвести до осмотичного набряку і лізису клітин [191, 249].

Нещодавні дослідження показали, що введення індометацину викликає ураження ентероцитів тонкої кишки за рахунок збільшення продукції вільних радикалів, що може бути результатом мітохондріальної дисфункції, посиленої інфільтрації слизової оболонки нейтрофілами у відповідь на дію препарату, підвищення активності ксантиноксидази або комбінації цих факторів [164].

НПЗП-індукована мітохондріальна дисфункція в основному пояснюється роз'єднанням окисного фосфорилування, що, в свою чергу, призводить до зниження клітинного співвідношення АТФ/АДФ та порушення мембранного потенціалу мітохондрій [159, 180]. Зниження мембранного потенціалу призводить до відкриття мітохондріальних пор перехідної проникності (MPTP) та вивільнення цитохрому с, що є ознакою апоптозу [242]. Іншими дослідженнями встановлено, що індометацин зв'язується з ділянкою поблизу I комплексу та убіхінону, що сприяє генерації АФК всередині мітохондрій [40]. Вільні радикали, що утворились діють, як молекули трансдукції сигналу та активують прозапальні цитокіни [169, 217].

Дослідження на лінії клітин Сасо-2 показали, що розвиток оксидативного стресу за умов ведення індометацину також пов'язаний із зниженням співвідношення відновленого (GSH)/окисленого глутатіону (GSSG) і збільшенням продукції кисневих радикалів, ксантиноксидазної активності та процесів перекисного окиснення ліпідів [75, 164].

З іншого боку, прозапальний вплив індометацину пов'язаний з активацією NF-κB, індукцією міграції/інфільтрації слизової оболонки поліморфноядерними лейкоцитами та підвищеною експресією прозапальних цитокінів та молекул міжклітинної адгезії (ICAM-1 та P-селектину) [87, 164]. Ці прозапальні дії пов'язані з прооксидантним впливом, таким як збільшення експресії НАДФН оксидази та зниження активності каталази [238]. Поліморфноядерна міграція під час запальної реакції опосередковується через взаємодію між молекулами адгезії, присутніми в мембрані ендотеліальних клітин і нейтрофілів [86]. Збільшення активності мієлопероксидази (МПО), свідчить про посилення інфільтрації нейтрофілів слизової оболонки органів травної системи. МПО – прозапальний фермент, що локалізується в нейтрофільних гранулоцитах та каталізує реакцію утворення гіпохлорної кислоти з пероксиду водню [122, 180]. Приєднання нейтрофілів до ендотелію судин може призвести до обструкції капілярів, що викликає до зменшення кровотоку слизової оболонки органів травної системи.

Поліаміни, путресцин, спермідин відіграють важливу роль у процесах росту і проліферації клітин. Вони також мають вирішальне значення для багатьох етапів реституції у відповідь на пошкодження шлунково-кишкового тракту з боку подразників, таких як НПЗП. Внутрішньоклітинний рівень поліамінів регулюється ферментом орнітиндекарбоксилаза (ОДК) та спермідин/спермін N¹-ацетилтрансферази. Високі рівні поліамінів призводять до швидкої проліферації, тоді як показано, що нижчі рівні сприяють апоптозу. Показано, що НПЗП індукують токсичну дію *in vitro* на ракових клітинах шляхом зменшення внутрішньоклітинних поліамінів (до 50 %) через інгібування ОДК. Результати досліджень дозволяють припустити, що пригнічення синтезу поліамінів може сприяти пошкодженню клітин за умов дії НПЗП шляхом запобігання загоюванню ран через інгібування як реституції, так і проліферації епітеліальних клітин. Нещодавнє дослідження, проведене на щурах, показало, що екзогенно введений спермін суттєво зменшив площу уражень шлунку та нормалізував підвищену секрецію кислоти у тварин, які отримували індометацин [168].

Ферменти ліпооксигенази (5-ЛОГ, 8-ЛОГ, 12-ЛОГ, 15-ЛОГ-1 та 15-ЛОГ-2) каталізують перетворення арахідонової кислоти на лейкотрієни, ліпоксини та гідроксіейкозатетраєнові кислоти (НЕТЕ). Цитохром P-450 монооксигеназний шлях в мікросомах включає епоксигенази та ω-гідроксилази, з утворенням епоксиейкозатрієнових кислот та 20-НЕТЕ, відповідно [206, 237].

В результаті зниження активності ізоформ ЦОГ відзначається активація ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти та збільшення продукції лейкотрієнів (ЛТВ₄, цистеїніл ЛТ - ЛТС₄, ЛТD₄ та ЛТЕ₄), що відіграють значну роль у процесах виразкування за умов дії НПЗП [239].

ЛТВ₄ – медіатор запалення, що виявляє ряд біологічних властивостей, включаючи стимуляцію лейкоцитарного хемотаксису та регуляцію прозапальних цитокінів шляхом зв'язування з G-білокспряженими рецепторами – Ltb4r1 або Ltb4r2. Ltb4r1 (також відомий як Blt1) є високоафінним рецептором, специфічним для ЛТВ₄, і локалізується в різних запальних та імунних клітинах, включаючи гранулоцити, еозинофіли, макрофаги, диференційовані клітини Th1, Th2 та Th17,

ефекторні CD8 Т-клітини, дендритні клітини та остеокласти, тоді як Ltb4r2 (Blt2) є низькоафінним рецептором [138]. Було встановлено, що ЛТ та НЕТЕ можуть безпосередньо активувати НАДФН-оксидазу, що призводить до збільшення продукції АФК та розвитку оксидативного стресу, шляхом транслокації субодиниці p47^{PHOX} у плазматичну мембрану [185].

1.4. Роль NO-синтазної системи у процесах цитопротекції та ульцерогенезу у слизовій оболонці органів травлення

Нітроген оксид (NO) є важливою внутрішньоклітинною та міжклітинною сигнальною молекулою, що бере участь в регуляції різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесів в серцево-судинній, нервовій, імунній системах та органах травної системи [35, 136, 145, 146, 170]. З іншого боку, ця молекула може виступати як вільний радикал, з'єднуватись з іншими молекулами і, відповідно, утворювати стійкі радикали (пероксинітрит, сульфонітрити, S-нітрозотіоли тощо), а також нітрувати цитоплазматичні амінокислоти та білки, що викликає цитотоксичні процеси при патологічних станах [188, 235].

Біосинтез NO в організмі здійснюється з L-аргініну та молекулярного кисню з використанням НАДФН як донора електронів і використовуючи гем, ФМН, ФАД та тетрагідробіоптерин (H₄B) як кофактори. Загальна реакція складається з двоступеневого оксидативного перетворення L-аргініну до NO та L-цитруліну з проміжним утворенням N^oгідрокси-L-аргініну [58, 84, 132, 161].

На сьогодні ідентифіковано три ізоформи NO-синтаз (NOS), які забезпечують біосинтез NO: eNOS ендотеліальна (eNOS), нейронна NOS (nNOS), індукцибельна NOS (iNOS). Відзначається різна локалізація ізоформ NOS в органах травної системи, а саме nNOS локалізується у цитозолі неадренергічних нехолінергічних нейронах кишки, в міоцитах, епітеліальних, опасистих клітинах та нейтрофілах, eNOS - в ендотеліальних клітинах, тоді як iNOS експресія збільшується після її індукції у макрофагах, нейтрофілах, епітеліоцитах та ендотеліоцитах [156].

Біосинтез NO у травній системі може проходити не тільки ферментативним шляхом. Другий шлях отримання газового медіатора передбачає відновлення нітрату (NO_3^-) до нітриту (NO_2^-) та подальше відновлення до NO. Відновний шлях є основним способом отримання NO бактеріями, які володіють нітрат- і нітритредуктазною активностями [146, 194, 241].

Виділяють конститутивні ізоформи фермента, а саме eNOS і nNOS, які є Ca^{2+} /кальмодулін залежними ферментами та постійно експресуються в клітині. Індуцибельна ізоформа NOS не експресується за умов норми і може бути індукована прозапальними цитокінами, бактеріальними ліпополісахаридами, активованими макрофагами та забезпечує синтез NO незалежно від внутрішньоклітинних концентрацій кальцію [184, 200]. Згідно даних літератури, синтез NO за допомогою cNOS є короткочасним, з отриманням низьких кількостей (наномолях), тоді як iNOS синтезує NO у високих кількостях (мікромолях). Низька концентрація NO, що виробляється конститутивною ендотеліальною NOS (eNOS), збільшує кровообіг, допомагаючи загоєнню ран шляхом стимулювання ангіогенезу у пошкодженій слизовій оболонці органів травної системи [132].

За фізіологічних умов у ендотеліоцитах кровоносних судин, NO синтезується в низьких концентраціях конститутивною NOS, після чого дифундує до гладких м'язів судин, де реагує з гемом розчинної гуанілатциклази (sGC) внаслідок чого утворюється вторинний месенджер – циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ). Останній діє через протеїнкіназу G та призводить до релаксації гладком'язових клітин і вазодилатації і посиленню кровотоку органів [52, 97, 154, 215, 240].

Надпродукція газового медіатора під впливом iNOS може призвести як до протективного, так і до цитотоксичного впливу, що залежить від типу клітини де відбувається його синтез. Багато клітин можуть збільшувати експресію iNOS для їхньої функції у захисті проти мікробних та вірусних патогенів, що призводить до утворення NO-радикалів або S-нітрозотіолів або ONOO^- в клітині-господаря або в самих мікроорганізмах.

Активність iNOS у макрофагах регулюється і модулюється клітинними рецепторами, такими як Toll-подібні рецептори та CD14. CD14 є рецептором ліпополісахариду (ЛПС) і відіграє важливу роль у прозапальних реакціях в моноцитах та макрофагах шляхом активації NF-κB [45, 51].

Продукція NO за участі iNOS, в основному регулюється на рівні транскрипції. Залежно від активатора або типу клітин різними сигнальними шляхами активують експресію мРНК iNOS протеїнкіназа C, тирозинкіназа, raf-1 протеїнкіназа, мітогенні активовані протеїнкінази (MAP кінази), та інгібують – білкові тирозинфосфатази, фосфоінозитид-3-кіназа [51, 135].

Транскрипційні фактори, такі як NF-κB і AP-1 опосередковують експресію iNOS та інших індукцибельних генів, таких як ЦОГ-2, VCAM-1 (молекула адгезії судинних клітин-1), ICAM-1 (молекула міжклітинної адгезії 1) в імунних та запальних реакціях. NF-κB присутній у цитозолі як неактивний комплекс IκB-NF-κB. Комплекс IκB-NF-κB фосфорилується IκB кіназою (ІКК) шляхом активації позитивними модуляторами, такими як екзогенний індуктор (ЛПС), ендогенні індуктори (цитокіни, гамма-інтерферон (IFNγ) та фактор некрозу пухлини α (TNFα)), які полегшують транслокацію вільного NF-κB від цитозолу до ядра та індукцію експресії гена iNOS. Регуляція iNOS через NF-κB є важливим механізмом у розвитку запальних процесів [51, 200, 233].

Нещоданими дослідженнями було встановлено, що NO також може сам регулювати свою продукцію. Позитивний зворотній зв'язок регуляції експресії iNOS відзначається в мезангіальних клітинах нирок та судинних гладком'язових клітин, що опосередкований через підвищення внутрішньоклітинного рівня цАМФ шляхом інгібування фосфодіестерази III [45, 192].

Механізм дії NO залежить від концентрації газового медіатора і може бути прямим або опосередкованим активними формами азоту. Молекулярні механізми, що опосередковують біологічну активність NO, можна розділити на три шляхи. По-перше, NO легко реагує з металами, такими як залізо, мідь та цинк. Прикладом такої взаємодії може бути каталаза, яка являє собою гемопроїєн, та забезпечує інактивацію пероксиду водню. NO реагує з Fe²⁺, що

призводить до гальмування каталазної активності і призводить до збільшення внутрішньоклітинних концентрацій пероксиду водню та може сприяти цитотоксичності NO. По-друге, NO здатний індукувати утворення S-нітрозотіолів у реакціях нітрозилування з SH-групами різних білків, що беруть участь у регуляторних механізмах клітин [174, 178, 212]. По-третє, в результаті взаємодії NO з супероксидним аніоном або киснем утворюється пероксинітрид (ONOO^-), який є потужним оксидантом, здатним модифікувати білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти [124, 199, 253].

Оксид азоту, що продукується nNOS походження є регуляція процесів моторики шляхом інгібування неадренергічних нехолінергічних (NANC) нейронів, які інервують гладку мускулатуру за участі nNOS-залежної активації гуанілат-циклази. Інші ключові у регуляції моторики нейротрансмітери як вазоактивний інтестинальний пептид (VIP), аденозин трифосфат і карбон монооксид (CO) також реалізують свою функцію у кон'югації із NO як NANC інгібітори [177].

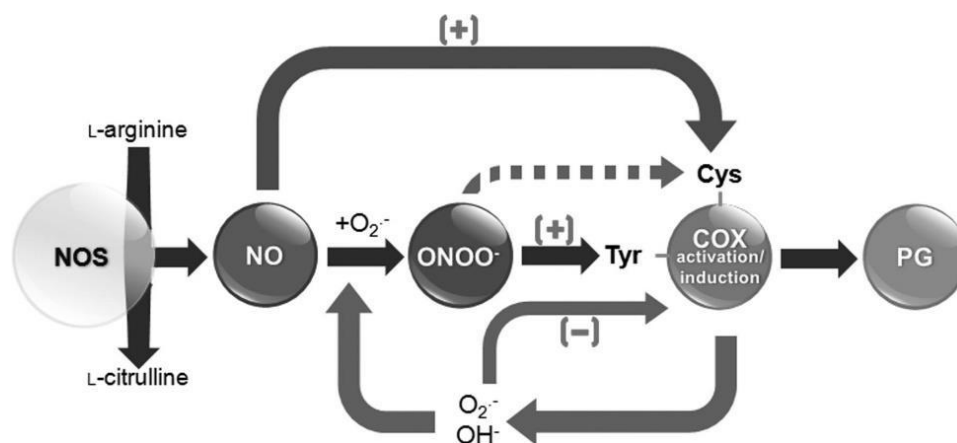


Рис. 1.2. Взаємозв'язок між системами NOS/NO та ЦОГ/ПГ [208]

У ряді нещодавніх досліджень було встановлено що NO регулює тонус гладкої мускулатури стравоходу та підтверджено, що відсутність імунореактивності та ферментативної активності NOS у нейронах зумовлює виникнення синдрому ідіопатичного розширення стравоходу. Більш вивченою є фізіологічна роль NO у шлунку та кишечнику, а саме у процесі регуляції

наповнення та подальшої евакуації хімусу, що відбувається під впливом інсуліну, який зумовлює експресію NOS [88].

Ключовою ізоформою NO-синтази відповідальною за NO-регульовану вазодилатацію у гастроінтестинальному тракті є ендотеліальна NOS. Експресія якої здійснюється в основному у ендотеліальних клітинах васкулярних каналців розташованих вздовж кишківника, печінки, підшлункової залози, включно з артеріальними, венозними та мікроциркуляторними судинами. Окрім того, було встановлено, що експресія eNOS може також здійснюватись у клітинах гладкої мускулатури кишківника та інтерстиціальних клітинах Кахаля. Продукція NO ендотеліального NO-синтазного походження регулюється численними факторами, зокрема, гормонами, рядом лікарських засобів та паракринною сигнальною системою, які підвищують експресію eNOS особливо у поєднаному впливі зі стресом, інсуліном, брадикініном тощо.

Однією із специфічних функцій оксиду азоту можна віднести його здатність пригнічувати адгезію та активацію специфічних гемопоетичних клітин, тим самим попереджувати виникнення судинного стазу та подальшого ішемічного ураження тканин. Найбільш чутливими клітинами крові до впливу на них оксиду азоту є тромбоцити та лейкоцити. У випадку лейкоцитів, оксид азоту інгібує їх адгезію до судинного ендотелію, частково гальмуючи їх міграцію через судинну стінку шляхом впливу на білок клітинної поверхні селектин-Р та трансмембранний гетеродимерний рецептор бета-інтегрин (CD11/CD18). Окрім того у механізмах NO-опосередкованої адгезії лейкоцитів залучені інші сигнальні шляхи за участі фосфоліпази A₂, фактору активації тромбоцитів (ФАТ) та лейкотрієну B₄. NO-опосередковане інгібування агрегації тромбоцитів значною мірою зумовлене цГМФ-РІЗ кіназо-залежним сигнальним шляхом, хоча було ідентифіковано альтернативні механізми інгібування агрегації незалежні від цГМФ особливо шляхом пероксинітритного азотування білків [60, 176].

1.5. Біохімічна роль гідрогену сульфід у травній системі

У регуляції цитопротекції органів травної системи значну роль також відіграє гідроген сульфід (H_2S), який приймає участь у механізмах цитопротекції, регуляції тону судин слизових оболонок органів травлення, проявляє антиоксидантні властивості [76, 89, 167, 244].

Синтез H_2S у клітинах ссавців здійснюється шляхом зворотнього транссульфування. У процесі біосинтезу зазначеного газового медіатора важливу роль відіграють 2 піридоксаль 5'-фосфат (PLP)-залежні ензими – цистатіон- γ -ліаза (CSE) та цистатіонін- β -синтаза (CBS), які каталізують утворення H_2S , амоніаку та пірувату із *L*-цистеїну та гомоцистеїну [64, 182]. Слід зазначити, що PLP-домен є спільним для CSE та CBS і відіграє вирішальну роль у проявах їхньої каталітичної активності. На відміну від цистатіонін- γ -ліази, фермент цистатіонін- β -синтаза містить у структурі домену сімдесят амінокислотних залишків, а наявність термінальної аміногрупи у структурі зумовлює виконання ряду важливих функцій. По-перше дана термінальна група є місцем зв'язування для інших газових медіаторів таких як нітрогену оксиду (NO) та карбону оксиду (CO). По-друге аміногрупа CBS слугує редокс-сенсором, що регулює продукцію H_2S [224]. По-третє термінальні фрагменти виконують роль кисневого медіатора для регулювання процесів деградації CBS. Варто відмітити, що при збільшенні парціального тиску кисню відбувається окиснення та подальша конформаційна перебудова CBS шляхом активації Lon-протеаз [187, 251].

Подібно до CSE та CBS цистеїн амінотрансфераза (CAT) використовує PLP як кофактор і каталізує перетворення цистеїну до 3-меркапто-пірувату. Використовуючи у ролі кофактора йони Zn^{2+} , 3-меркапто-піруват сульфуртрансфераза (MST) трансформує атом сірки сульфонових груп 3-меркаптопірувату до інших акцепторів сульфуру. По-суті, MST діє у якості переносника сірки, більш ніж як фермент, який каталізує утворення H_2S за участі CAT та MST індукованих реакцій утворюючи тіосульфоксид. Лише при наявності певних умов органічно-зв'язана сірка тіосульфоксидної групи може елімінувати чи відновлюватись з утворенням H_2S [127, 130, 251, 252].

Інший сульфур-вмісний ензим роданаза (також відомий як тіосульфат сульфуртрансфераза) відіграє також ключову роль у ендогенному метаболізмі H_2S . Слід зазначити, що на відміну від MST, який локалізується у цитозолі та мітохондріях, роданаза є виключно мітохондріальним протеїном [251].

Враховуючи високу розчинність H_2S у воді та здатність до дисоціації метаболічні шляхи обміну зазначеного газового медіатора є достатньо складними. Так, у циркуляторному руслі та цитозолі H_2S взаємодіє із метгемоглобіном чи іншими металопротеїнами, які відіграють роль депо органічно-зв'язаних сполук сірки. Окрім того, у мітохондріях H_2S шляхом реакцій окиснення та метилування перетворюється до тіосульфату, сульфіту або сульфату [226]. Мітохондріальна детоксикація H_2S також реалізується при дії сульфід-хінон-оксидоредуктази. У цитозолі H_2S метилюється за участі ферменту тіол-S-метилтрансферази з утворенням метантіолу та диметилсульфіду. Надлишкова кількість H_2S з організму легко екскретуються сечею та виділяється через легені у вигляді сульфатів, тіосульфатів та сульфідів [127, 129, 141].

H_2S викликає S-сульфгідрування великої кількості клітинних білків, що слугує можливим механізмом впливу газового медіатора на функцію протеїнів та ензимів. Процес S-сульфгідрування білків за допомогою H_2S полягає у взаємодії вивільненого сульфуру з тіольними групами цистеїнових залишків у результаті чого утворюється персульфіди (-SSH), що обумовлює підвищену хімічну реактивність білків [100].

H_2S відіграє ключову роль як сигнальна молекула що забезпечує функціонування травної, серцево-судинної, нейрональної, сечостатевої та дихальної систем. Одна із перших молекул для якої було виявлено афінність до H_2S була цитохромоксидаза, інгібування якої виявило токсичність даної сполуки у значних концентраціях, шляхом інгібування окислювального фосфорилування та синтезу АТФ у мітохондріях [67].

Ключовою біологічною функцією H_2S є здатність регулювати тонус судин та артеріальний тиск. H_2S -індуковане розширення кровеносних судин пов'язують із відкриттям АТФ-чутливих калієвих каналів. Проте нещодавні дослідження

показали, що вазодилатація деяких гладких м'язів судин (наприклад, висхідного відділу шлунка миші) у відповідь на дію NaHS здійснюється не через відкриття K^+ АТФ каналів, а за рахунок активації фосфатази легких ланцюгів міозину [141]. Механізм відкриття АТФ-чутливих калієвих каналів пов'язаний із зв'язуванням H_2S із цистеїновими залишками та сприянням сульфгідруванню цих каналів [100, 125, 183]. В результаті цих процесів відзначається інактивація потенціал-чутливих кальцієвих каналів L-типу, що викликало зменшення внутрішньоклітинної концентрація Ca^{2+} і є передумовою розслаблення гладких м'язів.

Важливо відмітити, що H_2S володіє вираженим впливом на гладку мускулатуру органів травної системи, що проявляється у пригніченні моторики шлунку та кишки. Зазначений ефект в основному обумовлений множинною дією H_2S на апамін-чутливі та глібенкламід-чутливі АТФ-залежні калієві канали. У ряді досліджень було встановлено вплив H_2S на інтерстиціальні клітини Кахаля (ІКК), які виконують функцію регуляторів фазових коливань потенціалу мембран гладкої мускулатури. Окрім того, вплив H_2S на ІКК зумовлений також наявністю у них ензимів CBS та CSE. Так, високі концентрації H_2S зумовлюють деполяризацію ІСС, активують АТФ-залежні калієві канали та збільшують мітохондріальне поглинання кальцію, викликаючи пригнічення їх збудження та повне припинення відповіді на подразнення. Окрім цього нещодавними дослідженнями був показаний інший механізм H_2S -індукованої релаксації гладких м'язів кишки, що полягав у пригніченні Rho-кінази та активації фосфодіестерази, що призводив до зниження RhoA/Rho-кіназного та підвищення цГМФ/протеїн кіназа G шляху [49].

H_2S , як відомо, діє і на ряд інших іонних каналів. В дослідженнях було показано, що H_2S інгібує ВКСа-каналів (Ca^{2+} -керовані K^+ -канали великої провідності) в клітинах культури НЕК- 293, тоді як в пухлинних клітинах гіпофіза щурів спостерігався протилежний ефект. Крім того, H_2S інгібує Ca^{2+} канали L-типу в кардіоміоцитах, внутрішньоклітинні хлоридні канали в лізосомальних везикулах серця щурів; він активує канали транзитного рецептор-потенційного ванілоїду (TRPV) в сечовивідних шляхах та гладких м'язах дихальних шляхів. Біологічне

значення цих різноманітних ефектів H_2S на іонні канали (крім K^+_{ATP} каналів) все ще в процесі дослідження [141, 183].

Важливу роль у розвитку протизапальної дії газового медіатора відіграє взаємодія H_2S з внутрішньоклітинними факторами транскрипції [243]. В результаті досліджень було показано, що $NaHS$ інгібує активацію NF- κ B, індукованого ЛПС, у культивованих макрофагах RAW 264.7 [105]. Було встановлено, що газовий медіатор інгібує деградацію I κ B- α в енхансері гена та транслокацію NF- κ B в ядро. В результаті зменшеної активації NF- κ B в клітинах є зниження регуляції ряду прозапальних генів, у тому числі тих, які кодують iNOS та ЦОГ-2, а також зниження регуляції прозапальних цитокінів/хемокінів та молекул адгезії [141]. Слід зазначити, що зменшення запалення під впливом H_2S здійснюється шляхом зниження рівня експресії цитокінів таких, як TNF- α , інтерлейкінів IL-1 β , IL-8 та інтерферону γ . У роботах K.L. Flannigan та співавторів [119] було також вивчено регуляторну взаємодію між H_2S та IL-10, що у експериментальних дослідженнях на інтерлейкін-дефіцитних мишах спостерігалось пригнічення синтезу H_2S у товстій кишці з подальшим виникненням виразкового коліту.

Інші фактори транскрипції також є мішенями для H_2S . Наприклад, введення GYY4137 (донора H_2S) щурам із ЛПС-індукованим запаленням призвело до активації STAT3 (перетворювача сигналу і активатора транскрипції 3), що як відомо регулює експресію багатьох генів, які опосередковують проліферацію (c-fos) та ангиогенез (фактор росту ендотелію судин) [141, 214].

Нещодавні дослідження виявили, що H_2S може збільшити зв'язувальну активність Nrf2-ARE і підвищувати регуляцію експресії антиоксидантних ферментів та забезпечувати стійкість тканин до оксидативного стресу [16, 106]. У ряді досліджень було відзначено, що введення $NaHS$ призвело до сульфгідрування Keap1, що значно знизило взаємодію Keap1/Nrf2 та стимулювало ядерну транслокацію Nrf2 [94, 109].

Також встановлено, що введення донорів H_2S за умов запалення у різних органах викликає зростання активності СОД [16, 80, 255]. В дослідженнях Magierowski M. et al. [80] було відзначено, що попереднє введення $NaHS$ на моделі

ішемії/реперфузії у щурів призводило до підвищення експресії мРНК для СОД та глутатіонпероксидази. В нещодавніх дослідженнях було доведено, що окрім дисмутації супероксид аніону ($O_2^{\cdot-}$) до H_2O_2 та O_2 , СОД може вступати в реакцію з H_2S з утворенням персульфідів [160].

H_2S – потужний відновник і нуклеофіл, який виступає скавенджером вільних радикалів за допомогою передачі електрона або атома водню. Таким чином, H_2S може брати участь у багатьох реакціях і було зафіксовано, що він може реагувати з АФК та АФН, такими як пероксинітрит, супероксид аніон, пероксид водню, гіпохлоритна кислота та гідропероксили ліпідів. Встановлено, що H_2S інгібує продукцію супероксид аніону в ендотеліальних клітинах людини та клітинах гладких м'язів судин шляхом зменшення експресії та активності НАДФН-оксидази [219].

Нещодавно було встановлено, що H_2S сприяє збільшенню рівня відновленого глутатіону і тим самим пригнічує розвиток оксидативного стресу у мітохондріях. Цей ефект було пов'язано з підвищеною активністю γ -глутамілцистеїнсинтетази та регуляцією цистинового транспорту (активує цистин-глутаматні антипортери, стимулює надходження цистеїну в мітохондрії) [127, 129, 183].

Шлях PI3K/Akt бере участь у регуляції росту, проліферації, міграції та обміну речовин. Активація PI3K призводить до синтезу PIP3, який активує протеїнкіназу Akt. Фосфорильована Akt регулює клітинні процеси шляхом фосфорилування ряду субстратів, включаючи фактори транскрипції I κ B кінази, Bad, каспази-9 і forkhead. У дослідженнях X. Zhou та ін. [47] було показано, що пригнічення шляху PI3K/Akt викликало зменшення транскрипційного фактора Nrf2 і збільшення продукції АФК в кардіоміоцитах неонатальних щурів, за умов введення NaHS, що дозволило дослідникам припустити, що H_2S може проявляти антиоксидантні властивості через активацію Nrf2 за допомогою PI3K/Akt сигнального шляху.

Показано, що протеїнкінази також слугують мішенями H_2S . Газовий медіатор, утворений внаслідок надмірної експресії CSE, викликає тривалу активацію/фосфорилування позаклітинної регульованої сигналом кінази (ERK) у культурах клітин лінії HEK-293, а аналогічний ефект також спостерігається в

клітинах гладких м'язів судин у щурів та ракових клітин товстої кишки людини [104, 107, 141].

У ряді експериментальних досліджень також встановлено, що H_2S шляхом активації первинних аферентних нейронів, що іннервують кишківник регулює больову (ноціцептивну) реакцію у органах травлення [82]. Зазначений ефект зумовлений деградацією H_2S до тіосульфату у просвіті кишки та подальшою активацією кальцієвих каналів Т-типу. Оскільки Zn^{2+} діє як інгібітор кальцієвих каналів Т-типу, особливо ізоформи $Ca_v3,2$, H_2S , який зв'язує Zn^{2+} , опосередковано активує кальцієві канали Т-типу.

Слід зазначити, що H_2S відіграє помітну роль у процесах регуляції адгезії лейкоцитів до судинного ендотелію та їх подальшої екстравазації [243]. У нормі зазначений медіатор проявляє інгібувальний вплив на дані процеси шляхом впливу на β_2 -інтегрин (LFA), Р-селектин та ендотеліальні молекули міжклітинної адгезії (ICAM-1). У ряді робіт було встановлено ряд закономірностей між дефіцитом вітамінів групи В та H_2S , що проявлялися значним рівнем міграції лейкоцитів до органів та тканин. Цікаво, що ефект зниження адгезії лейкоцитів спостерігається шляхом активації АТФ-залежних калієвих каналів, який легко можна досягти введенням сполук-донорів H_2S , що було підтверджено на експериментальних моделях виразкового коліту у тварин [250]. Окрім того інгібувальний вплив на міграцію лейкоцитів реалізується також завдяки здатності H_2S інгібувати мієлопероксидазу. У ряді робіт було підтверджено здатність H_2S зумовлювати апоптоз нейтрофілів та підвищувати здатність до фагоцитозу макрофагів шляхом зміни їхнього фенотипу до M2, що відповідно призводить до пригнічення запального процесу.

Крім вказаних ефектів, припускають, що H_2S здатний стимулювати секрецію бікарбонатів у шлунку та дванадцятипалій кишці тим самим зменшуючи потенційно шкідливий вплив гідрохлоридної кислоти. Окрім того H_2S також безпосередньо може гальмувати секрецію гідрохлоридної кислоти [103].

Між системами синтезу NO та H₂S виявлені тісні взаємозв'язки. Окрім їх синергнічного впливу на регуляцію тонусу судин, було відзначено ряд інших взаємодій. Відомо, що H₂S може зв'язуватись із метаболітами NO та призводити до утворення тіонітритів, S-нітрозотіолів, нітроксили. Окрім цього, H₂S може вступати в реакцію з пероксинітридом, що підтверджує антиоксидантні властивості газового медіатора [140].

Дані останніх досліджень довели, що зменшення концентрації H₂S в результаті пригнічення активності цистатіон-γ-ліази призводить до зниження активності eNOS шляхом посттрансляційної модифікації. Оскільки фосфорилювання амінокислот S1177 та T495 регулює активність eNOS, тим самим посилюючи або інгібуючи її активність, було встановлено, що зниження активності цистатіон-γ-ліази призводить до зменшення фосфорилювання в активному центрі eNOS^{S1177} та посиленого фосфорилювання eNOS^{T495}, що характеризується пригніченням активності eNOS [102]. Встановлено, що численні фактори, включаючи інсулін, кортикостероїди, брадикінін і H₂S, стимулюють вироблення NO через PI3K/Akt-індуковане фосфорилювання eNOS^{S1177}.

У попередніх дослідженнях з використанням безклітинної модельної системи було показано, що NO інгібуює активність CBS шляхом зв'язування з гемовою групою ферменту. Формування п'яти координуючих нітрозильних комплексів заліза порушує зв'язування CBS з його ендогенними лігандами (такими як цистеїн та гомоцистеїн), що призводить до інгібування активності CBS [179]. Аналогічним чином було показано, що NaSH безпосередньо інгібуює рекомбінантну eNOS. Механізм все ще незрозумілий, але автори зауважили, що ферментативна активність eNOS була інгібована шляхом потенційної взаємодії між кофакторами NaSH та eNOS, такими як НАДФН або H₄B [98].

Не дивлячись на те, що відкриваються нові молекулярні механізми дії простагландинів, NO та H₂S, недостатньо вивченими є питання зниження токсичного впливу НПЗП на епітеліоцити тонкої кишки; потребують поглибленого вивчення зміни NO-синтазної системи за умов поєднаного впливу НПЗП різного

механізму дії та стресу; не дослідженими є питання цитопротекторної дії новосинтезованих похідних тіазолідинонів у тонкій кишці.

Вивчення та аналіз цих процесів не тільки поглиблюють існуючі погляди на механізми цитопротекції та ульцерогенезу за участі NO-синтазної системи та про-і антиоксидантних процесів, що важливо для експериментальної та клінічної гастроентерології, але і дасть можливість оцінити похідні 4-тіазолідинонів як прекурсорів нових фармакологічних препаратів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти та умови дослідження

Експерименти проводились на 264 білих нелінійних щурах-самцях масою 200-230 г, які утримувались в умовах віварію ЛНМУ імені Данила Галицького, відповідно до положень та дозволу університетського комітету з біоетики (протокол № 3 від 16.03.2015) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовують для експериментів і в інших наукових цілях (Страсбург, Франція 1986) та згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001).

Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Під час експерименту тварини знаходились у віварії при температурі повітря $+(21-23^{\circ}\text{C})$, вологості повітря 50-60 % та стандартному світловому режимі день-ніч. Експериментальні групи включали 8 тварин кожна і формувалися за віком та масою тіла. Перед проведенням експерименту, протягом 24 год тварини мали доступ до води і були позбавлені їжі. У процесі виконання досліджень було сформовано контрольні групи тварин, що включали 8 тварин. У якості плацебо для контрольної групи тварин було використано фізіологічний розчин. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на тлі уретанового знечулення (30 мг/кг внутрішньоочеревинно).

2.2. Моделювання ушкоджень СОТнК

Для дослідження механізмів дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на систему L-Arg/NOS/NO, розвиток оксидативних процесів, вміст гідроген сульфїду та визначення їх біохімічної ролі у процесах розвитку ушкоджень СОТнК було обрано моделі стрес- та НПЗП-індукованого ураження. Дані моделі були обрані з

урахуванням того факту, що ключову роль у розвитку деструктивних ушкоджень органів травної системи, відіграє вплив стресу та неконтрольоване застосування НПЗП.

2.2.1. Модель адреналін-індукованого стресу (АІС). З метою моделювання ушкоджень СОТнК було використано адреналінову модель [1]. Слід зазначити, що адреналін як ключовий маркер стресу призводить до розвитку ульцерогенних пошкоджень органів травної системи внаслідок виникнення гіпоксичного стану та збільшення рівня активних форм кисню [1, 28, 78]. При проведенні експериментальних досліджень тваринам вводили адреналін натще у дозі 2 мг/кг внутрішньоочеревино. Тривалість експерименту становив 24 год.

2.2.2. Модель водно-імобілізаційного стресу (ВІС). Методика ВІС є широко використовувана з поміж ряду методик моделювання стресу та найбільшою мірою відображає ті зміни у травній системі, що відбуваються за умов гострого стресу у людей [78, 101].

ВІС моделювання за методикою Takagi et al., 1968 [227] з модифікацією [78]. Дослідних тварин іммобілізували у пласткових контейнерах, які надалі занурювали вертикально у воду до рівня яремної ямки щура упродовж п'яти годин. Температура води становила $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

2.2.3. Модель індометацин-індукованих уражень СОТнК. Згідно даних літератури було встановлено, що серед НПЗП найбільшою ентеротоксичною дією володіє індометацин [164, 228]. Тому моделювання НПЗП-індукованих уражень слизової оболонки тонкої кишки проводили згідно методики Філаретової Л. П. [50]. Індометацин вводили підшкірно у дозі 35 мг/кг. Тривалість експерименту становила 72 год, при цьому тварини мали вільний доступ до їжі та води.

2.3. Серії досліджень

Згідно поставлених завдань дисертаційної роботи було проведено 9 серій досліджень, описаних нижче (табл. 2.1).

У першій серії досліджень було визначено вплив різних моделей стресу (ВІС та АІС) на морфологічний стан, рівень нітрузо-оксидативних процесів, вміст ТБК-активних продуктів та активність ензимів антиоксидантного захисту.

Друга серія досліджень – вивчення впливу різних за механізмом дії НПЗП на морфологічний стан, параметри NO-синтазної системи, процеси ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК. Для оцінки ролі різних ізоформ циклооксигенази та ліпооксигенази нами були застосовані наступні блокатори: активність ЦОГ-1/ЦОГ-2 інгібували шляхом введення індометацину (Sigma); целекоксиб (Sigma) вводили як селективний інгібітор ЦОГ-2; інгібування активності ЦОГ-2/5-ЛОГ проводили шляхом введення сполуки 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензи-ліден)-тіазол-4-он - 2A5DHT. Через 24 год після введення досліджуваних сполук тварин виводили з експерименту.

В третій серії досліджень було вивчено поєднаний вплив стресу та різних за механізмом дії НПЗП (ВІС + інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; ВІС + інгібітор ЦОГ-2; ВІС + інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ) на стан газових медіаторів (NO, H₂S) та про-/антиоксидантну систему у СОТнК. Досліджувані інгібітори ЦОГ/ЛОГ вводили одноразово перорально за 30 хв до моделювання ВІС.

У IV серії – для порівняльної оцінки дії H₂S-вивільняючого напроксену (сполуки АТВ-346) та напроксену, було проведено дослідження їх впливу на параметри системи L-Arg/NOS/NO, інтенсивність процесів ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК.

Для того, щоб порівняти дію обох інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2, АТВ-346 (Antibe Therapeutics Inc) вводили перорально в однаковій дозі із напроксомом (Sigma). Тривалість дослідження становила 24 години, після чого тварин виводили з дослідження.

Групи тварин та серії досліджень

		Серії досліджень								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Група тварин (n=8)	Вплив стресу різного генезу	Вплив стресу різного генезу	Вплив НПЗП різного механізму	Поєднана дія стресу та інгібіторів ЦОГ/ЛОГ	Дія інгібіторів ЦОГ-1 /ЦОГ-2	Дія інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 за умов стресу різного генезу	Дія інгібіторів	Дія інгібіторів ЦОГ/ЛОГ	Вплив інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на тлі стресу	Дія інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на тлі НПЗП-індукованих уражень
	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль	Контроль
	ВІС 5 год	Індометацин	ВІС 5 год	Напрооксен	ВІС	АІС	АІС	Les-5054	ВІС	Індометацин
	АІС	Целекоксиб	ВІС + Індометацин	АТВ-346	ВІС + Напроксен	АІС + Напроксен	АІС + Напроксен	Les-5055	ВІС+ Les-5054	Індометацин + Les-5054
	2A5DHT	ВІС + Целекоксиб	ВІС + Целекоксиб		ВІС + АТВ-346	ВІС + АТВ-346	АІС + АТВ-346		ВІС+ Les-5055	Індометацин + Les-5054
		ВІС + 2A5DHT	ВІС + 2A5DHT							
Об'єкти досліджень		Слизова оболонка тонкої кишки Плазма крові								

У V-VI серії досліджень було визначено дію H_2S -вивільняючого напроксену (сполуки АТВ-346) на морфологічний стан кишки, рівень нітрузо-оксидативних процесів, вміст ТБК-активних продуктів та активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК у порівнянні із напроксом на тлі різних моделей стресу (ВІС та АІС). Інгібітори ЦОГ-1/ЦОГ-2 вводили одноразово перорально за 30 хв до моделювання ВІС або АІС.

У VII серії було проведено дослідження дії похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-5054 та Les-5055), які виступають інгібіторами ЦОГ-2/5-ЛОГ на морфологічний стан, вміст газових медіаторів (NO , H_2S), процеси ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту, мієлопероксидази у СОТнК.

Вибір досліджуваних сполук у цій серії досліджень обумовлений тим, що похідні 4-тіазолідинону проявляють широкий спектр біологічної активності [41, 137]. Наявність лабільної сірки у структурі цих сполук, дозволяє припустити, що Les-5054 (5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-2-тіоксо-тіазолідин-4-он) та Les-5055 ([3-(3,5-дитертбутил-4-гідроксифеніл)-2-меркаптоакрилова кислота]) являються потенційними донорами гідроген сульфїду, за рахунок чого може бути знижена ентеротоксична дія інгібіторів ЦОГ/ЛОГ (рис 2.1).

Досліджуванні сполуки (Les-5054 та Les-5055) вводили одноразово перорально. Тривалість експерименту становила 24 год.

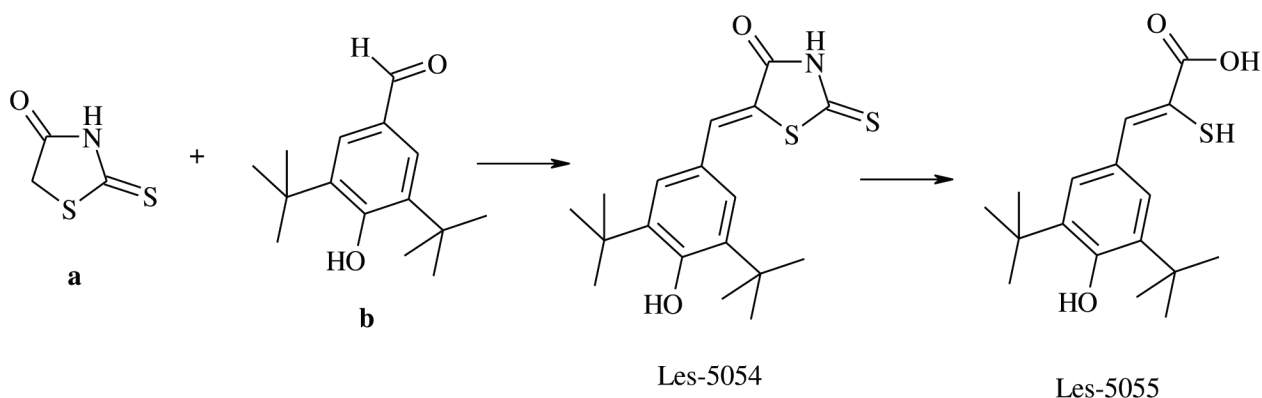


Рис. 2.1. Синтез та структури сполук Les-5054 та Les-5055. (а) 2-тіоксо-тіазолідин-4-он; (б) 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гідроксибензальдегід

У VIII серії було проведено визначення поєднаної дії похідних 4-тіазолідинону (сполук Les-5054 та Les-5055) та стресу (ВІС) на морфологічний стан кишки, параметри системи L-Arg/NOS/NO, інтенсивність процесів ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК. Досліджувані сполуки вводили одноразово перорально за 30 хв до моделювання ВІС.

У IX серії досліджень було проведено визначення дії похідних 4-тіазолідинону (сполук Les-5054 та Les-5055) на морфологічний стан кишки, параметри системи L-Arg/NOS/NO та рівновагу про-/антиоксидантних процесів у СОТнК на тлі тривалого введення інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацину (дозою 35 мг/кг). У цій серії дослідження сполуки Les-5054 та Les-5055 вводили перорально кожні 24 години. Тривалість досліду становив 72 години.

Інгібітори ЦОГ-1/ЦОГ-2 (індометацин, напроксен, АТВ-346), інгібітор ЦОГ-2 (целекоксиб) та інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ (сполуки 2A5DHT, Les-5054 та Les-5055) вводили у дозі 10 мг/кг. Дози, які були обрані для дослідження є загальноприйнятими в експериментах на щурах [79]. Перед введенням усі досліджувані сполуки розчиняли у DMSO та ресуспендували в 1% розчині карбоксиметилцелюлози та вводили в об'ємі 1 мл.

2.4. Методика відбору тканин та одержання гомогенатів СОТнК

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на тлі уретанового знечулення у дозі 30 мг/кг. Після декапітації тваринам розрізали передню черевну стінку по білій лінії живота та виділяли тонку кишку. Відібрану тонку кишку розрізали вздовж, промивали фізіологічним розчином та за допомогою скальпеля відсепаровували СОТнК. Потім СОТнК гомогенізували в охолодженому 0,9% розчині натрію хлориду у співвідношенні 1:5 при швидкості обертів гомогенізатора 3000 об/хв. Гомогенати центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв для осадження грубодисперсних залишків клітин.

2.5. Гістологічні дослідження

Для проведення гістоморфометричних досліджень СОТнК при розтині тварин були відібрані фрагменти порожньої та клубової кишки, які фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, з наступною заливкою у парафін згідно загальноприйнятої методики [9]. Препарати фарбували гематоксиліном та еозином. Мікроскопічні дослідження препаратів проводили за допомогою мікроскопа Olympus BX 41 при збільшенні $\times 200$. Морфометричний аналіз висоти та ширини ворсинок проводили за допомогою програми UTHSCSA Image Tool for Windows (version 2,0) в інтерактивному режимі.

2.6. Біохімічні методи аналізу

2.6.1. Визначення вмісту білка в гомогенатах тканин. Для визначення загального вмісту білка у гомогенатах СОТнК використовували мікробіуретовий метод [207]. У пробірки вносили 1,75 мл 6% розчину натрію гідроксиду і по 0,1 мл гомогенату та реактиву Бенедикта. Для рівномірного розподілу забарвлення вміст пробірки перемішували. Через 15 хв визначали оптичну густину при довжині хвилі 330 нм на біохімічному аналізаторі StatFax 1904 (США). Отримані результати за допомогою калібрувального графіка переводили у концентрацію виражену у мг/мл.

2.6.2. Визначення активності ізоферментів NO-синтази в гомогенатах СОТнК. Для визначення сумарної активності NO-синтази (iNOS, cNOS) у епендорфи вносили 30 мкл гомогенату СОТнК та інкубували 60 хв у термостаті при температурі 37°C разом з 1 мл інкубаційної суміші, яка містить 25 мМ Трис-НСІ (рН= 7,4), 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CaCl₂, 1 мМ НАДФН+Н⁺, 1 мМ L-Аргініну [31]. Реакцію зупиняли шляхом додавання 0,3 мл 2 н перхлоратної кислоти. Отриману суміш відцентрифугували при 3000 об/хв і в надосадовій рідині за кольоровою реакцією з антипірином визначали вміст L-цитруліну. Для визначення

індуцибельної NOS (Ca^{2+} -незалежної NOS) використовували аналогічну методику визначення, яка відрізнялася вмістом інкубаційної суміші – замість CaCl_2 добавляли 2 мкмоль ЕДТА.

Активність NO-синтаз визначалась спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм на біохімічному аналізаторі StatFax 1904 (США) та виражали в нмоль новоутвореного L-цитруліну за 1 хвилину в розрахунку на 1 г білка в досліджуваній пробі. Активність cNOS визначали як різниця між рівнем експресії загальної NOS та iNOS. Активність виражали у нмоль/хв \times мг протеїна.

2.6.3. Визначення вмісту нітрит- та нітрат-аніону в гомогенатах СОТнК.

Враховуючи короткий період існування NO, його вміст оцінювали за рівнем стабільних метаболітів. Вміст NO^{2-} та NO^{3-} визначали з використанням реактиву Гріса [22]. До 0,1 мл гомогенату додавали 0,51 мл води та вносили 0,3 мл 2 н розчину перхлоратної кислоти для осадження білків та центрифугували при 3000 об/хв. Потім до 0,27 мл супернатанту додавали 0,03 мл 3 М гідроксиду амонію, 0,06 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти, 0,6 мл 10% розчину ацетатної кислоти та 30 мг суміші цинкового пилу та мангану сульфату у співвідношенні 1:100 (для відновлення нітрату до нітриту) або мангану сульфату (у випадку визначення нітрит-аніону) та 0,54 мл реактиву Грісса. Вміст пробірки перемішували, центрифугували при 3000 об/хв та визначали оптичну густину при довжині хвилі 550 нм проти розчину дистильованої води. Концентрацію NO^{2-} та NO^{3-} визначали за калібрувальним графіком і виражали у мкмоль/г протеїна.

2.6.4. Визначення активності аргінази в гомогенатах СОТнК.

Активність аргінази визначали за концентрацією сечовини [91]. У пробірку відмірювали 50 мкл гомогенату, 20 мкл 0,1 М розчину гліцинового буферу (pH=9,5) та 10 мкл 10 мМ розчину MnCl_2 , суміш перемішували та інкубували 10 хв у термостаті при температурі 37°C. Потім додавали 10 мкл 0,25 М розчину L-аргініну та знову інкубували протягом 30 хв при 37°C. Після закінчення інкубації, реакцію зупиняли

шляхом внесення 100 мл 10% розчину перхлоратної кислоти та центрифугували при 3000 об/хв. До 100 мкл надосадової рідини додавали 100 мкл дистильованої води, 10 мкл 4% етанольного розчину ізонітропропіофенону, 10 мкл суміші концентрованих сульфатної та фосфатної кислот у співвідношенні 1:3 та ставили на водяну баню протягом 60 хв. Потім до суміші додавали 500 мкл дистильованої води і визначали оптичну густину при довжині хвилі 540 нм. Ативність аргінази визначали за формулою:

$$A = C_{\text{сечовини}} / t / C_{\text{Б}}, \text{ де}$$

C – концентрація сечовини (мкмоль/л);

t – час (30 хв);

$C_{\text{Б}}$ – концентрація білка (мг/мл)

Активність аргінази виражали в мкмоль сечовини/хв×мг протеїна

2.6.5. Визначення активності мієлопероксидази в гомогенатах СОТнК.

Активність мієлопероксидази визначали за методом, що ґрунтується на взаємодії із *o*-діанізидином [55]. У пробірку вносили 300 мкл дистильованої води додають 300 мкл 0,3% розчину пероксиду водню, 500 мкл 0,02 М розчину *o*-діанізидину та 10 мкл гомогенату. Вміст пробірки перемішували і визначали оптичну густину при довжині хвилі 460 нм. Через 10 хв повторно проводили визначення оптичної густини. Активність ферменту розраховували за формулою:

$$A = (D_2 - D_1) / t / C,$$

де: D_1 – оптична густина після внесення гомогенату;

D_2 – оптична густина через 10 хв;

t – час (10 хв);

C – концентрація білка (мг/мл).

2.6.6. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів в гомогенатах СОТнК. Методика визначення вмісту ТБК-активних продуктів ґрунтується на реакції з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [36]. У центрифужну пробірку відмірювали 3 мл 10 мМ К,Na-фосфатного буферного розчину (рН=7,4),

приготовленого на 125 мМ розчині КСl, додавали 0,1 мл гомогенату, 0,5 мл 1 мМ розчину КМnO₄, вміст пробірки перемішували і через 10 хв додавали 0,5 мл 10 мМ розчину FeSO₄. Через 10 хв повторно додавали 0,5 мл 10 мМ розчину FeSO₄, вміст пробірки перемішували і через 5 хв додавали 1 мл 20% розчину ТХО. Реакційну суміш центрифугують при 3000 об/хв. Потім до 2 мл надосадової рідини додавали 1 мл 0,5% розчину ТБК та 0,5 мл 1 М розчину НСl та ставили на водяну баню протягом 20 хв. Після охолодження проводили визначення оптичної густини ТБК-активних продуктів при довжині хвилі 534 нм.

Вміст ТБК-активних продуктів розраховували за формулою:

$$C_{\text{ТБК}} = (D \times V_1) / (\varepsilon \times V_2 \times V_3)$$

де, D – оптична густина проби;

V₁ – кінцевий об'єм реакційної суміші;

V₂ – об'єм взятої надосадової рідини;

V₃ – об'єм гомогенату;

ε – коефіцієнт молярної екстинкції комплексу МДА з ТБК, рівний 1,56•10⁵/М•см

Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали у мкмоль/г.

2.6.7. Визначення активності супероксиддисмутази (СОД) в гомогенатах СОТнК. Метод базується на здатності СОД інгібувати відновлення нітротетразолію синього супероксидними радикалами [39]. У пробірку вносили 0,1 мл гомогенату, 0,1 мл дистильованої води, 0,05 мл хлороформу, 0,1 мл етанолу, 60 мг калію дигідрофосфату, вміст пробірок перемішували та центрифугували 30 хв при 6000 об/хв. В окремі пробірки відміряли 0,05 мл супернатанту, додавали 0,75 мл інкубаційної суміші, яка містить 37 мг ЕДТА-Na, 330 мг нітротетразолію синього, 55 мг феназину метасульфату, розчинених у 300 мл фосфатного буферу (рН=7,8) та 0,025 мл розчину відновленого НАДН. В контрольну пробірку аналогічно дослідній пробірці вносили реактиви, тільки замість супернатанту вносили 0,05 мл дистильованої води. Абсорбцію світла вимірювали при λ 540 нм проти контролю.

Активність СОД визначали за допомогою калібрувального графіку одержаного при розрахунку відсотку відновлення нітротетразолієвого синього шляхом оцінки вмісту ферменту в досліджуваному біоматеріалі у МО/мг.

2.6.8. Визначення активності каталази в гомогенатах СОТнК. Активність каталази визначали за методом Королюка М. А. [24]. У дві пробірки (контрольну та дослідну) вносили 2 мл 0,03% розчину пероксиду водню. В контрольну пробірку додавали 1 мл 4% розчину молібдату амонію приготовленого на 0,025 н розчині сульфатної кислоти. У дослідну пробірку додавали 0,1 мл гомогенату. Вміст пробірок перемішували та інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Після реакції у контрольну пробірку вносили 0,1 мл гомогенату, а в дослідну пробірку – 1 мл 4% розчину молібдату амонію приготовленого на 0,025 н розчині сульфатної кислоти. Для осадження білка, в обидві пробірки додавали по 1 мл 0,25 н сульфатної кислоти та центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Оптичну густину контрольної та дослідної пробірки визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм. Активність каталази визначали за формулою:

$$A = (D_{\text{контр.}} - D_{\text{досл.}}) \times 4,1 \times n / 22,2 \times C \times t \times V,$$

де $D_{\text{контр.}}$ – оптична густина поглинання контрольної проби;

$D_{\text{досл.}}$ – оптична густина поглинання дослідної проби;

5 – розведення гомогенату (1:5);

C – концентрація білка (мг);

t – час інкубації (10 хв);

V – об'єм гомогенату (0,1 мл)

Активність каталази виражали у мкмоль H_2O_2 /хв×мг протеїна.

2.6.9. Визначення вмісту H_2S в плазмі крові. Вміст H_2S визначали за реакцією з N,N-диметил-n-фенілендіаміном у присутності FeCl_3 та виражали у мкмоль/л [25]. У дослідну пробірку вносили 0,5 мл 1 % розчину цинку ацетату, 2 мл дистильованої води, 0,1 мл плазми крові, 0,5 мл розчину n –фенілендіаміну та 0,4 мл 30 мМ FeCl_3 на 1,2 М HCl . Вміст пробірки перемішували та інкубували 5 хв

при кімнатній температурі. Після реакції додавали 1,0 мл 20% розчину ТХО і центрифугували 15 хв при 3000 об/хв. Контрольну пробу готували аналогічно дослідній, тільки замість плазми крові додавали 0,03 мл дистильованої води та 0,07 мл розчину альбуміну. Стандартну пробу готували аналогічно дослідній пробі, тільки замість плазми крові додавали розчин Na_2S (10 мкг/мл). Оптичну густину поглинання проб визначали при довжині хвилі 670 нм.

2.6.10. Визначення вмісту L-аргініну в плазмі крові. Визначення концентрації L-аргініну проводили за реакцією Сакагучі [8]. У центрифужну пробірку додавали 0,2 мл плазми крові та 0,2 мл 5% розчину ТХО і центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. До 0,2 мл супернатанту додавали 0,4 мл 10% розчину натрію гідроксиду, 0,02 мл 0,02% спиртового розчину α -нафтолу, 0,02 мл гіпобромідного реактиву, 0,08 мл 40% розчину сечовини і 0,88 мл дистильованої води. Вміст пробірок перемішували. Через 20 хв визначали оптичну густину поглинання при довжині хвилі 500 нм. Концентрацію L-аргініну визначали за калібрувальним графіком і виражали у мкмоль/л.

2.7. Мікробіологічні методи аналізу

Для проведення мікробіологічних досліджень був використаний класичний культуральний метод [30]. Фрагменти проксимального та дистального відділу кишки розрізали, очищали від вмісту, зіскрібок зі СОТнК зважували та розводили в ізотонічному розчині. Посів здійснювали на щільні живильні середовища, у напіврідкий тіогліколевий агар та стандартне середовище (MRS-агар) для виявлення лактобактерій, середовище Блаурока для дослідження біфідобактерій, у середовище Кітта-Тароцці для виявлення клостридій.

Підрахунок кількості колоній бактерій (колонієутворюючих одиниць – КУО), які вирости на чашках Петрі, проводили після закінчення інкубації (24 год при 37°C) і перераховували на 1 г матеріалу, отримуючи мікробне число. Відповідність

пророслих мікроорганізмів встановлювали за морфологічними і культуральними властивостями. Кількісні показники мікроорганізмів представляли в КУО/г.

2.8. Статистичне опрацювання результатів досліджень

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програмного пакету Microsoft Excel. Взаємозв'язки досліджуємих показників встановлювались з використанням коефіцієнта кореляції Спірмена (r). Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими в результаті досліджень (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). Для оцінки вірогідності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента. Достовірною вважалась різниця за умов $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Роль газових медіаторів та ензимів антиоксидантного захисту в нормі, при патології та дії НПЗП

Стрес є одним з ключових факторів, що призводить до порушень функціонування органів травлення та виникнення деструктивних уражень у їх слизових оболонках. Активація при дії стресу симпатoadреналової системи викликає різке зростання у крові адреналіну та кортизолу. Адреналін за участі $\alpha 2$ -адренорецепторів, що локалізуються на гладких м'язцях кровоносних судин, викликає вазоконстрикцію, а у епітеліоцитах відбувається вивільнення лізосомальних ензимів, що на тлі зростання продукції різних радикалів (кисневих, ліпідних, пероксинітриту тощо) призводить до пре- та виразкових ушкоджень слизових оболонок [26, 43, 78].

Важливим аспектом є вивчення ролі газових медіаторів (NO та H₂S), які за фізіологічних умов синергічно впливають на регуляцію тонуна кровоносних судин, тоді як за умов виникнення запалення у слизових оболонках органів травлення, вони проявляють вплив на окисно-відновні процеси, приймають участь у модифікації активності багатьох ензимів, можуть утворювати прооксидантні сполуки [98, 157, 160, 244]. Дослідження дії стресу на СОТнК та зміни системи NO-синтаза/аргіназа та процеси ПОЛ вивчено недостатньо.

3.1.1. Морфологічний стан, активність системи NO-синтаза/аргіназа, вміст ТБК-активних продуктів та активність ензимів антиоксидантного захисту у слизовій оболонці тонкої кишки за умов стресу. Для дослідження впливу стресу нами були використані дві моделі – водно-імобілізаційний (ВІС) та адреналін-індукований (АІС), що обумовлено більш глибоким аналізом дії різних варіантів стресу на ульцерогенні процеси у СОТнК.

Отримані нами результати свідчать, що як за умов впливу ВІС, так і при дії АІС виражених макроскопічних змін у СОТнК не було виражено. Для більш детального аналізу змін слизової оболонки тонкої кишки були проведені гістологічні дослідження.

У тварин контрольної групи дистальний відділ СОТнК характеризується наявністю мікрворсинок, основу яких утворює сполучна тканина, у якій розташовані лімфатичний синус та кровоносні капіляри. На зовнішній поверхні ворсинок знаходяться стовпчасті епітеліоцити, поодинокі келихоподібні клітини та ендокриноцити (рис. 3.1 – 1А, 1В). Слід відзначити, що епітеліоцити швидко оновлюються – повна заміна епітеліоцитів у 12-палій кишці відбувається за 63 години, у клубовій за 52 години [34]. Власна пластинка СОТнК утворена пухкою сполучною тканиною, у якій містяться еластичні та ретикулярні волокна, лімфатичні фолікули. Крипти неглибокі, в них присутні значна кількість келихоподібних клітин, а також ентероендокринні клітини і клітини з ацидофільними гранулами (клітини Панета), малодиференційовані (камбіальні) епітеліоцити (рис. 3.1 – 1А, 1В).

Як представлено на рис. 3.1 – 2А, ВІС спричиняв виражені гістологічні зміни у слизовій оболонці порожньої кишки – ворсинки розширені в сторону просвіту кишки і звужені до основи, спостерігається десквамація епітелію ворсинок. Судини розширені і заповнені еритроцитами та плазмою крові. На поверхні ворсинок присутній клітинний детрит та секреторні маси. Строма ворсинок інфільтрована лейкоцитами. Відзначений набряк слизової оболонки клубової кишки за умов впливу стресу (рис. 3.1. – 2В). Серед стовпчастих епітеліоцитів з облямівкою присутня велика кількість келихоподібних клітин, строма ворсинки з ознаками набряку та інфільтрована лейкоцитами. Крипти глибокі, також містять велику кількість келихоподібних клітин. Власна пластинка інфільтрована лейкоцитами.

За умов впливу АІС ворсинки високі, вкриті епітелієм з облямівкою, серед яких присутні келихоподібні клітини. Строма ворсинок з ознаками набряку та інфільтрована лейкоцитами. Гемокапіляри розширені, заповнені плазмою крові. Крипти глибокі і мають будову подібну до контрольних тварин (рис. 3.1 – 3А).

Відзначали набряк сполучної тканини слизової оболонки та підслизового прошарку (рис. 3.1 – 3В). На поверхні слизової оболонки візуалізувалась надмірна кількість слизистого секрету. Окрім цього, спостерігалась поліморфноклітинна інфільтрація основної речовини стромы слизової оболонки нейтрофілами.

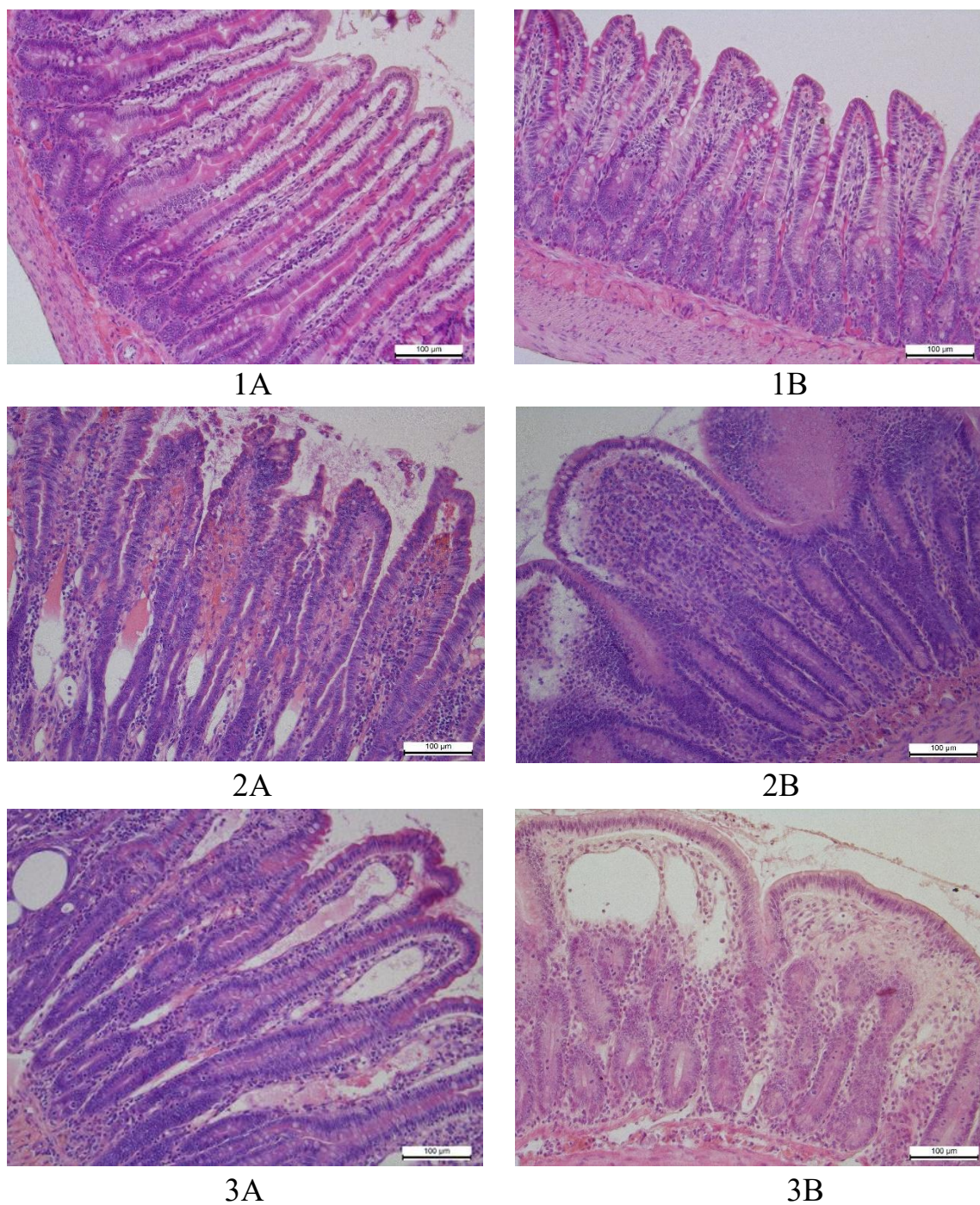


Рис. 3.1. Гістологічні зміни в СОТнК за умов норми та впливу ВІС або АІС. Гематоксилін та еозин x 200. 1 – контроль; 2 - дія ВІС; 3 – АІС. А – порожня кишка; В – клубова кишка

При морфометрії СОТнК було виявлено, що висота ворсинок порожнього відділу за умов дії ВІС збільшилась з $373,1 \pm 5,6$ мкм до $404,5 \pm 7,0$ мкм ($p < 0,01$), тоді як у клубовому відділі відзначалось збільшення висоти ворсинок на 16 % ($p < 0,01$), порівняно із значеннями контрольної групи. У тварин при моделюванні АІС було встановлено збільшення висоти ворсинок порожньої кишки з $373,1 \pm 5,6$ мкм до $409,3 \pm 6,2$ мкм ($p < 0,01$) та з $278,4 \pm 3,6$ мкм до $292,0 \pm 4,1$ мкм ($p < 0,05$) у клубовій кишці, що свідчить про односпрямований вплив ВІС та АІС (рис. 3.2 – А). Також було встановлено, що вплив стресу (ВІС та АІС) призводив до значного збільшення ширини ворсинок у клубовій кишці в два ($p < 0,01$) та 2,5 рази ($p < 0,01$), відповідно (рис. 3.2 – В). Розвиток набряку та дисциркуляторні зміни в судинах слизової оболонки за умов впливу стресу могло призводити до потовщення ворсинок.

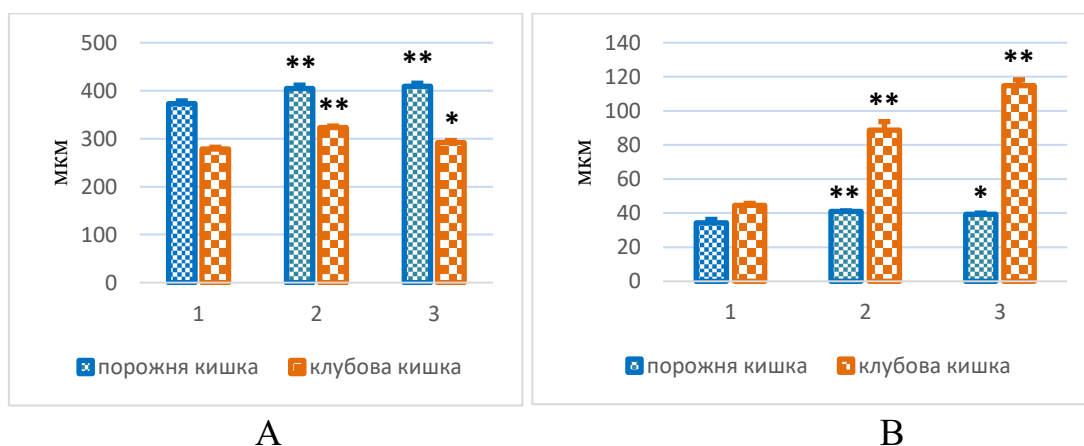


Рис. 3.2. Морфометричні показники слизової оболонки порожнього та клубового відділів кишки за умов норми та впливу ВІС або АІС ($M \pm m$, $n=8$). А – висота ворсинок; В – ширина ворсинок; 1 – контроль; 2 – дія ВІС протягом 5 год; 3 – АІС; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Отже, вплив ВІС та АІС викликали морфологічні зміни СОТнК, які проявлялись набряком слизової, зміною форм крипт, утворенням надмірної кількості слизистого секрету, що містив десквамовані стовпчасті ентероцити.

Розглядаючи стан системи NO-синтаза/аргіназа, зміни процесів ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту за умов дії стресу у порівнянні з контрольними тваринами у СОТнК відзначено наступне.

Нашими дослідженнями показано у СОТнК контрольної групи тварин високу активність сNOS, тоді як рівень активності іNOS була незначною (табл. 3.1). Вміст NO_2^- коливався у межах $1,2 \pm 0,1$ мкмоль/г, а сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ дорівнювала $3,4 \pm 0,8$ мкмоль/г (рис. 3.3).

Отже, у СОТнК стан системи NO-синтаза/аргіназа характеризується домінування активності сNOS, що забезпечує продукцію фізіологічної кількості нітрогену оксиду, який приймає участь у регуляції процесів кровоплину, секреції епітеліоцитів, процесах міжклітинної координації та цитопротекції.

За умов дії ВІС відзначена значна активація іNOS у СОТнК, яка зростала майже втричі ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою тварин, тоді як активність сNOS знижувалась на 57 % ($p < 0,01$), аргінази – на 65 % ($p < 0,01$). Вплив АІС на СОТнК також викликав зростання активності іNOS у 2,7 рази ($p < 0,01$), активність сNOS знижувалась на 41 % ($p < 0,01$). Концентрація L-аргініну в плазмі крові різко знижувалась при ВІС на 63 % ($p < 0,01$) та при АІС на 20 % ($p < 0,05$), що свідчить про використання L-аргініну крові іNOS клітинами слизової оболонки шляхом активації окисного метаболізму L-аргініну (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК за умов впливу ВІС та АІС, (M±m, n=8)

Група тварин	Активність іNOS, нмоль/хв×мг	Активність сNOS, нмоль/хв×мг	Аргіназа, мкмоль/хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л
Контроль	$66,1 \pm 24,9$	$728,6 \pm 66,1$	$0,2 \pm 0,03$	$46,7 \pm 3,6$
ВІС 5 год	$188,9 \pm 9,8^{**}$	$312,5 \pm 32,3^{**}$	$0,07 \pm 0,01^{**}$	$17,2 \pm 1,9^{**}$
АІС	$176,5 \pm 29,2^{**}$	$428,0 \pm 38,0^{**}$	$0,16 \pm 0,04$	$37,5 \pm 2,2^*$

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Відповідно до різкого зростання активності iNOS відзначалось надпродукція NO_2^- за умов стресу – більш ніж у два рази при дії ВІС та АІС ($p < 0,01$). Одночасно за умов ВІС та АІС спостерігалось зростання вмісту суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у СОТнК у 2,2 рази ($p < 0,01$) та 2,4 рази ($p < 0,01$) відповідно, порівняно із результатами контрольної групи тварин (рис. 3.3). Оцінюючи зміни в СОТнК за умов ВІС та АІС вмісту NO_2^- та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ можна стверджувати, що зростання їх рівня обумовлені в першу чергу підвищенням активності iNOS.

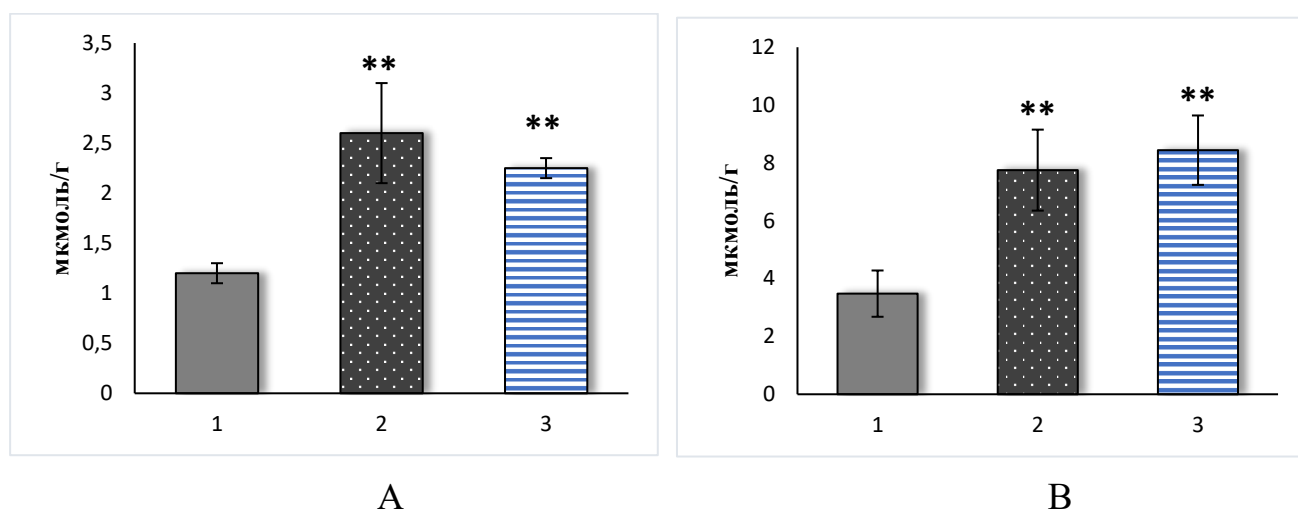


Рис. 3.3. Концентрація NO_2^- (А) та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$). 1 – Контроль; 2 – дія ВІС протягом 5 год; 3 – дія АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Відомо, що СОТнК є дуже чутлива до впливу ішемії, тоді як порушення кровопостачання та мікроциркуляції внаслідок посиленого впливу катехоламінів за умов стресу, навіть протягом короткого проміжку часу, призводить до розвитку гіпоксичного стану клітин кишки. Активація цих процесів спричиняє утворення значної кількості активних форм кисню (АФК), які проявляють високу реакційну здатність. Утворені АФК, а саме супероксид аніон (O_2^-) може вступати в реакцію з NO , що супроводжується синтезом пероксинітиту (ONOO^-) – потужного оксиданта, який індукує процеси пероксидного окиснення ліпідів [43, 165].

Стосовно змін концентрації H_2S у плазмі крові, то у тварин контрольної групи його вміст становив $88,4 \pm 2,7$ мкмоль/л. Вплив ВІС характеризувався

зниженням H_2S в плазмі крові, порівняно з контрольною групою тварин на 30 % ($p < 0,01$), тоді як при АІС концентрація H_2S мала тенденцію до зменшення (рис. 3.4).

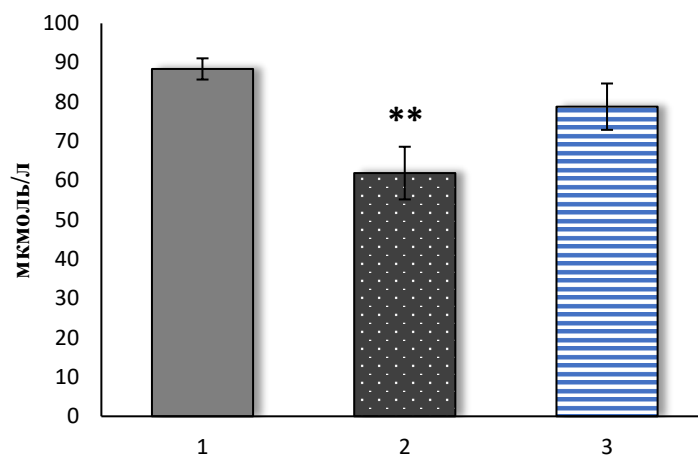


Рис. 3.4. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов норми та дії ВІС, АІС ($M \pm m$, $n=8$). 1 – Контроль; 2 – дія ВІС протягом 5 год; 3 – дія АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Оцінюючи динаміку змін газових медіаторів (NO та H_2S) у СОТнК за умов стресу відзначено зростання рівня NO_2^- та паралельне зниження вмісту H_2S , що може бути одним із основних факторів, який викликає порушення мікрогемодинаміки та призводить до розвитку гіпоксичного стану.

Процеси ПОЛ відіграють значну роль у реалізації метаболічних процесів в клітинах. Дія ВІС викликає інтенсифікацію пероксидних процесів у СОТнК та супроводжується зростанням вмісту ТБК-активних продуктів за умов ВІС на 40 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками контрольної групи. За умов АІС у СОТнК відзначалось зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 27 % ($p < 0,01$).

Активация процесів ПОЛ при стресі викликає пригнічення активності ферментів антиоксидантного захисту, а саме активність СОД знижувалась за умов ВІС на 15 % ($p < 0,05$) та при дії АІС 7 %. Активність каталази у СОТнК при дії ВІС та АІС достовірно не змінювалась порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Активність ензимів антиоксидантного захисту та концентрація ТБК-активних продуктів за умов норми та впливу ВІС, АІС у СОТнК (M±m, n=8)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6
ВІС 5 год	261,0±16,0**	20,2±1,8*	15,7±2,9
АІС	237,0±10,4**	22,2±0,9	20,3±1,3

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Утворення АФК спостерігається в результаті нормального клітинного метаболізму, проте за фізіологічних умов продукція та руйнування їх регулюється за допомогою антиоксидантної системи. У результаті проведених нами досліджень було встановлено, що за умов впливу ВІС відбувається інтенсифікація процесів ПОЛ, при цьому активність СОД пригнічувалась, а каталази – зростала, що викликало розвиток нітрузо-оксидативних процесів. Дані літератури свідчать, що відповідь АОС на вплив ВІС відрізняється в різних відділах травної системи та характеризується зростанням активності каталази та СОД за умов ВІС упродовж 5 год у слизовій оболонці шлунка [78]. Проте, відзначався протилежний напрямок змін активності каталази за умов АІС, що свідчить про більш ефективне знешкодження вільних радикалів. Наші дослідження співзвучні з результатами, у яких показано, що різні моделі стресу можуть проявляти різний ступінь впливу на активність антиоксидантних ферментів [54].

Активність МПО у СОТнК за умов дії різних видів стресу суттєво зростала. При дії ВІС рівень активності МПО збільшилась у 5 разів ($p < 0,01$); при АІС - у 3 рази ($p < 0,01$) (рис. 3.5). Оскільки МПО в основному виробляється активованими нейтрофілами, що знаходяться в слизовій оболонці, зростання цього ензиму розглядають як один із маркерів запалення.

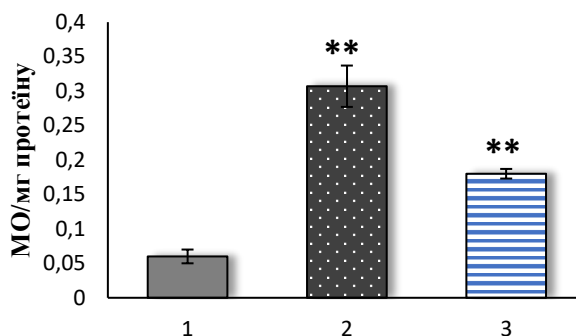


Рис. 3.5. Активність МПО в СОТнК за умов норми та дії ВІС, АІС ($M \pm m$, $n=8$). 1 – Контроль; 2 – дія ВІС протягом 5 год; 3 – дія АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Вплив стресу призводить до зростання активності МПО та, як результат посилення продукції гіпохлориту (HClO), який за фізіологічних норм проявляє протимікробну дію, проте надмірне утворення даного метаболіту може призвести до ушкодження клітин тонкої кишки. Зростання активності МПО також може бути пов'язаним із зниженням концентрації H_2S , оскільки цей газовий медіатор здатний пригнічувати процеси адгезії лейкоцитів (в першу чергу нейтрофілів) до ендотелію кровоносних судин [249, 250].

Отже, різні види стресу - ВІС та АІС викликають односпрямовані зміни активності системи NO-синтаза/аргіназа, процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту, МПО та вмісту H_2S , що свідчать про підвищення рівня нітрузо-оксидативних процесів у СОТнК. Порівняння рівнів зміни активності iNOS, аргінази, вмісту ТБК-активних продуктів, NO_2^- та H_2S за умов ВІС та АІС свідчить про їх односпрямований вплив у активації прозапальних механізмів у СОТнК.

Отримані нами результати дають змогу зробити наступні висновки:

1. Моделювання стресу (ВІС та АІС) не викликало розвитку видимих деструктивних змін СОТнК, проте при гістологічному аналізі відзначалось порушення цілісності слизового бар'єру, зростала інфільтрація нейтрофілами СОТнК, спостерігався набряк та порушення мікрогемодинаміки.

2. Дія ВІС протягом 5 годин характеризувалась більш вираженими змінами системи NO-синтаза/аргіназа. Стрес-індуковані зміни супроводжувались різким зростанням активності іNOS, МПО та підвищенням рівня процесів ліпопероксидації, тоді як активність сNOS та аргінази знижувалась, і як наслідок зростання вмісту метаболітів окиснення NO - нітратів та нітритів у СОТнК. Одночасно відзначалось суттєве зниження вмісту L-аргініну та H₂S у плазмі крові.

3. АІС викликав зростання активності іNOS, МПО, вмісту ТБК-активних продуктів, при цьому активність каталази зростає, паралельно знижувалась активність сNOS у СОТнК. Також спостерігалось незначне зниження вмісту L-аргініну та H₂S у плазмі крові.

4. Відмінність ВІС та АІС при дії на СОТнК пов'язана з більш вираженим впливом ВІС на нітрузо-оксидативні процеси.

3.1.2. Дослідження активності NO-синтази, процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ. Не дивлячись на те, що визначенню дії НПЗП приділяється значна увага, їх вплив на морфологічний стан органів травної системи та стан системи NO-синтази/аргіназа і процеси ліпопероксидації на сьогоднішній день потребує поглибленого вивчення.

Відомо, що НПЗП викликають деструктивні ушкодження СОШ, активують прозапальні ензими та процеси ліпопероксидації у органах травної системи [26, 78, 142]. Розвиток НПЗП-індукованих гастроінтестинальних ушкоджень пов'язують із пригніченням активності конститутивної ЦОГ-1, яка за фізіологічних умов забезпечує синтез гастропротекторних простагландинів, тоді як експресія індукційної ЦОГ-2 зростає при запаленні, канцерогенезі, під дією цитокінів,

факторів росту, бактеріальних полісахаридів. Проте інгібування активності ЦОГ при застосуванні НПЗП призводить до альтернативного шляху метаболізму арахідонової кислоти, що характеризується підвищення активності 5-ЛОГ та утворенням лейкотрієнів, які можуть підтримувати процес утворення виразок [138, 206].

Для більш детальної оцінки механізму дії різних класів НПЗП у тонкій кишці згідно завдань дослідження було проведено вивчення впливу блокаторів – неселективного інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацину, селективного інгібітора ЦОГ-2 целекоксибу та інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ сполуки 2A5DHT за умов одноразового перорального введення у дозі 10 мг/кг на стан системи NO-синтази/аргінази, процеси ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантної системи захисту в СОТнК та вміст H_2S у плазмі крові.

Отримані нами результати свідчать, що індометацин викликає розвиток структурно-геморагічних ушкоджень в СОТнК, що переважно проявляються в порожній кишці (рис. 3.6 – 2). Тоді як введення селективного інгібітора ЦОГ-2 целекоксибу та інгібітора ЦОГ-2/5ЛОГ сполуки 2A5DHT не призводило до видимих морфологічних змін у СОТнК, що узгоджується із даними літератури [131].

Гістологічними дослідженнями показано, що блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 призводить до розширення ворсинок в сторону просвіту кишки, спостерігається десквамація епітелію. Окремі ворсинки повністю позбавлені епітелію. На деяких ворсинках присутні конгломерати клітинного детриту. Спостерігається явище компресії ворсинок (просвіти між ворсинками майже відсутні). Судини гіпертрофовані, заповнені форменими елементами крові, серед яких переважають еритроцити. Строма ворсинок інфільтрована лейкоцитами, просвіт крипт звужений. Відзначається набряк власної пластинки (рис. 3.6 – 2).

За умов дії інгібітора ЦОГ-2 відзначається збільшення висоти ворсинок, на поверхні яких присутня велика кількість слизистого секрету. Строма з ознаками набряку та інфільтрована лейкоцитами. В окремих ворсинках присутня велика кількість гемокапілярів. На відміну від дії інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-

ЛОГ, селективне блокування ЦОГ-2 цефекоксибом призводило до збільшення глибини крипт, в яких відзначалась значна кількість келихоподібних клітин (рис. 3.6 – 3).

За умов інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ відзначалась інфільтрація ворсинок лейкоцитами, набряк строми ворсинок. На деяких ворсинках зафіксовано десквамований епітелій та продукти секреторної діяльності келихоподібних клітин. Крипти досить глибокі, на дні яких спостерігається потовщення епітелію за рахунок проліферації. Келихоподібних клітин з гранулами секрету дуже мало. Власна пластинка з ознаками набряку (рис. 3.6 – 4).

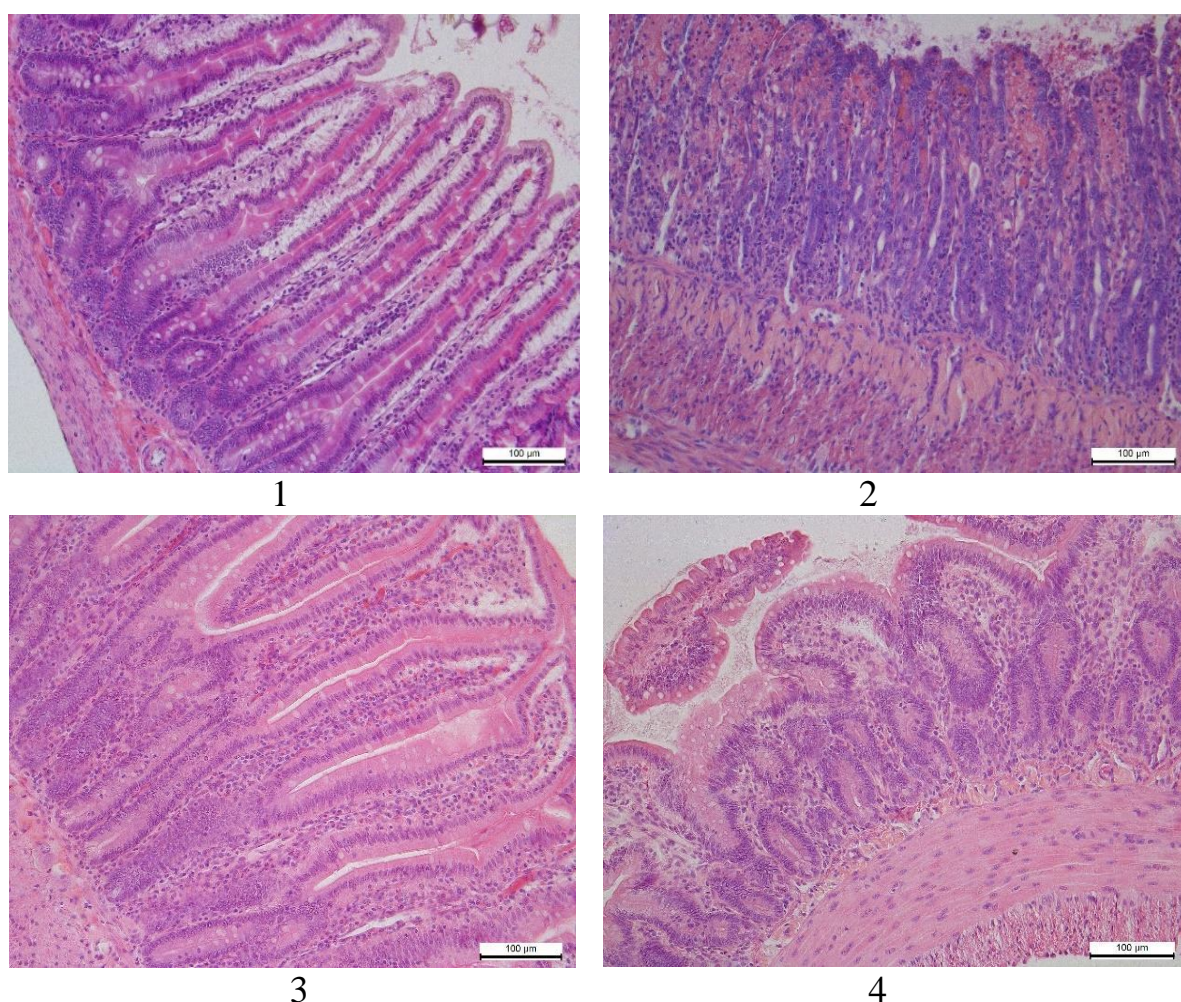


Рис. 3.6. Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов впливу НПЗП різного механізму дії. Гематоксилін та еозин x 200. 1 – контроль; 2 – інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – інгібітор ЦОГ-2; 4 – інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ

Аналізом отриманих морфометричних параметрів було встановлено, що висота ворсинок в порожньому відділі зменшується за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на 20 % ($p<0,01$) та 24 % ($p<0,01$), відповідно порівняно із значеннями контрольної групи, тоді як блокування ЦОГ-2 призводило до збільшення їх висоти з $373,1\pm 5,6$ мкм до $410,2\pm 4,2$ мкм ($p<0,01$) (рис. 3.7 – А). Ширина ворсинок слизової оболонки порожньої кишки за умов інгібування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ достовірно збільшувалась (рис. 3.7 – В).

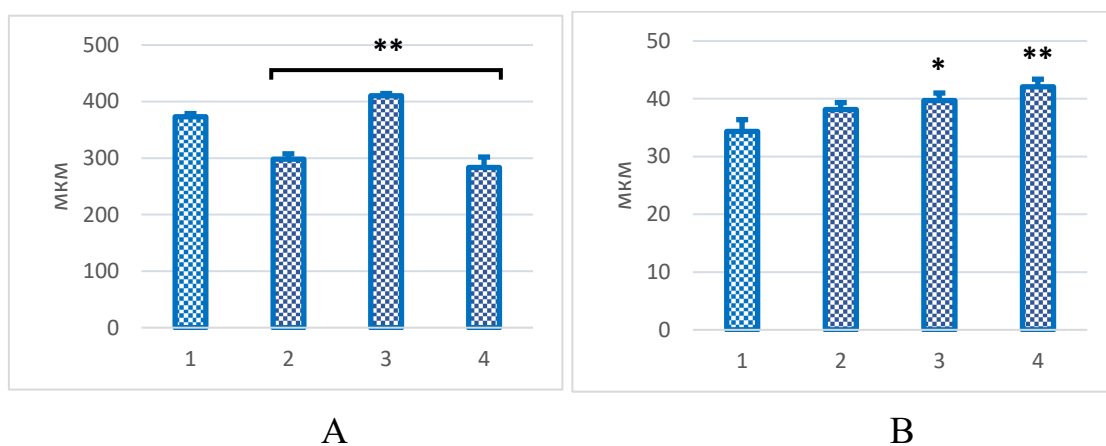


Рис. 3.7. Морфометричні показники слизової оболонки порожнього відділу кишки за умов дії НПЗП різного механізму дії ($M\pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок. 1 – контроль; 2 – інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – інгібітор ЦОГ-2; 4 – інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ; * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 викликало підвищення активності iNOS в СОТнК у 2 рази ($p<0,05$) порівняно з показниками контрольної групи тварин, при блокуванні ЦОГ-2 відзначалось підвищення активності – на 55% ($p>0,05$) та на 51% ($p>0,05$) за умов інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ; активність cNOS за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ мала тенденцію до зниження (табл. 3.3).

За умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином через 24 години після його введення було відзначено зниження активності аргінази майже втричі ($p<0,01$). При

цьому достовірних змін концентрації L-аргініну в плазмі крові за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ не було відзначено (табл. 3.3).

Отже, інгібування активності ЦОГ-1/ЦОГ-2 викликає зростання активності iNOS, що свідчить про тісний зв'язок між системами ПГ/ЦОГ та NO-синтазною системою.

Таблиця 3.3

Активність ізоформ NOS, аргінази в СОТнК та концентрація L-аргініну в плазмі крові за умов впливу НПЗП різного механізму дії ($M \pm m$, $n=8$)

Група тварин	Активність iNOS, нмоль/хв×мг	Активність cNOS, нмоль/хв×мг	Аргіназа, мкмоль/хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
Індометацин	125,5±14,5*	610,7±65,3	0,07±0,01**	39,4±5,7
Целекоксиб	102,5±34,3	613,1±49,4	0,16±0,04	40,0±8,7
2A5DHT	99,6±20,8	618,2±48,7	0,2±0,03	42,7±1,9

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

При вивченні самостійної дії блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на біосинтез NO у СОТнК було визначено зростання концентрації NO_2^- та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в СОТнК. За умов введення індометацину показано значне збільшення вмісту NO_2^- (в 1,8 рази, $p < 0,01$) та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (в 1,8 раз, $p < 0,01$) у СОТнК. При застосуванні целекоксибу та сполуки 2A5DHT було зафіксовано зростання NO_2^- в 1,8 рази ($p < 0,01$) та 1,7 рази ($p < 0,01$), відповідно. За умов

блокування ЦОГ-2 вміст суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ зростав у 1,7 рази ($p < 0,01$) та у 1,6 рази ($p < 0,01$) за умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ (рис. 3.8).

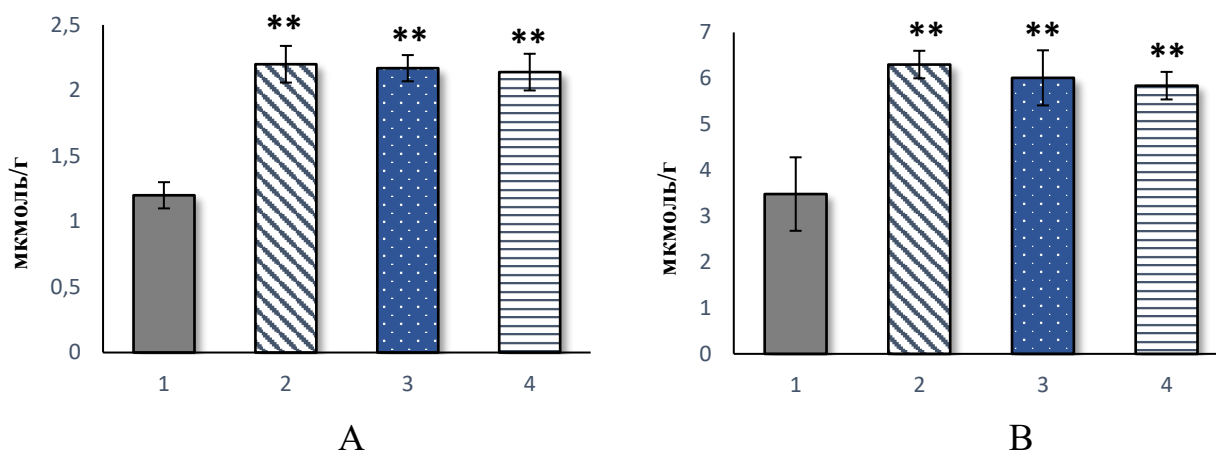


Рис. 3.8. Концентрація NO_2^- (А) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$). 1 – контроль; 2 – інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – інгібітор ЦОГ-2; 4 – інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Отже, введення неселективного блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацина призводило до більш виражених змін системи NO-синтаза/аргіназа та викликало підвищення активності iNOS та метаболітів окиснення NO (нітритів та нітратів) з одночасним зниженням активності аргінази у СОТнК порівняно до показників контрольної групи тварин. Блокування ЦОГ-2 целекоксибом також призводило до підвищення активності iNOS ($p < 0,05$), концентрації нітритів, нітратів та відзначалась тенденція до зниження активності аргінази у СОТнК та вмісту L-аргініну в плазмі крові. Отримані результати свідчать, що ПГ, які синтезуються ЦОГ-2 приймають участь у регуляції активності NO-синтази та можливий зсув метаболічного перетворення арахідонової кислоти у бік зростання продукції лейкотрієнів. За умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ було відзначено незначне зростання активності iNOS, вмісту нітритів, нітратів та зниження активності cNOS у СОТнК і концентрації L-аргініну в плазмі крові.

На сьогоднішній день було встановлено тісний взаємозв'язок між ЦОГ/ПГ та NOS/NO. Відомо, що пероксинітрит, продукт реакції між NO та супероксид

аніоном, відіграє важливу роль у регулюванні ферментів ЦОГ, оскільки пероксинітриг є потужним індуктором транскрипційного фактора NF- κ B, що призводить до збільшення експресії як iNOS, так і ЦОГ-2 за умов запалення [164, 217].

Дослідження останніх років показало, що НПЗП окрім блокування активності ЦОГ та пригнічення синтезу простагландинів, також впливають на каталітичну активність ферментів метаболізму H_2S , а саме зменшують його біосинтез, модулюючи експресію цистатіонін- γ -ліази, яка переважно експресується в клітинах серцево-судинної системи та шлунково-кишкового каналу [103]. Нашими дослідженнями показано, що за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 відзначалось зниженням даного газового медіатора у плазмі крові на 44 % ($p < 0,01$), при дії блокатора ЦОГ-2 – на 20 % ($p < 0,01$) та на 22 % ($p < 0,01$) за умов інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ, порівняно зі значеннями контрольної групи тварин (рис. 3.9). Отже, блокування синтезу ПГ та ЛТ за умов одноразового введення різних за механізмом дії НПЗП призводило до зниження концентрації H_2S у плазмі крові.

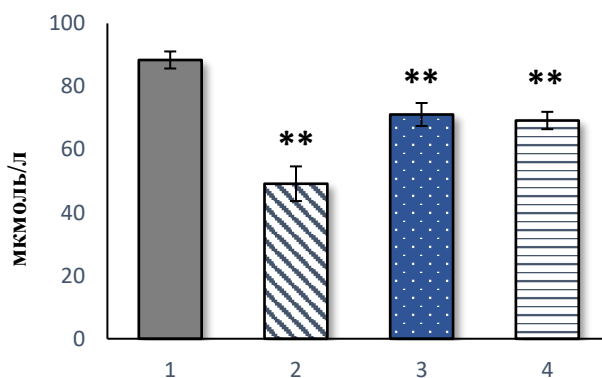


Рис. 3.9. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу НПЗП різного механізму дії ($M \pm m$, $n=8$). 1 – контроль; 2 – інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – інгібітор ЦОГ-2; 4 – інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ; ** – $P < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

За умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 активність МПО зростала на 66 % ($p < 0,05$) та на 83 % ($p < 0,05$) за умов дії селективного інгібітора ЦОГ-2. Застосування

блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ в меншій мірі призводило до зростання активності ферменту та на 50 % ($p < 0,05$) перевищував значення контрольної групи тварин, що виявляє вплив лейкотрієнів винтезованих ЛОГ (рис. 3.10).

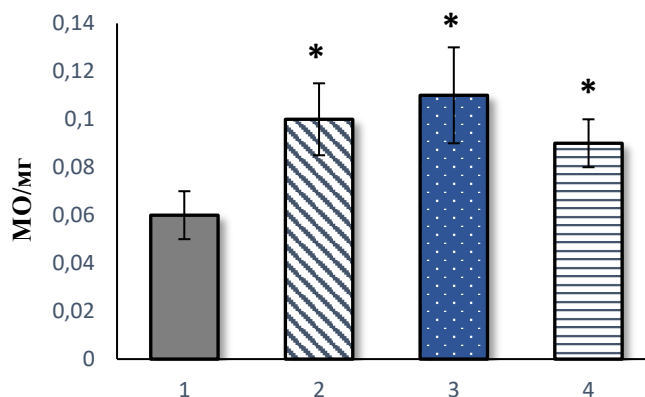


Рис. 3.10. Активність МПО в СОТнК ($M \pm m$, $n=8$). 1 – контроль; 2 – інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – інгібітор ЦОГ-2; 4 – інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ; * – $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи

Одним з найбільш індикаторних змін у клітині за умов запалення є показник рівня процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Концентрація ТБК-активних продуктів у СОТнК за умов самостійної дії блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 зростала на 17 % ($p < 0,05$) та 19 % ($p < 0,05$) за умов дії блокатора ЦОГ-2, що свідчить про інтенсифікацію процесів ліпопероксидації (табл. 3.4).

Введення сполуки 2A5DHT підвищувало активність СОД на 11 % ($p < 0,05$), натомість при інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином та ЦОГ-2 целекоксибом достовірних змін активності СОД не було відзначено. При цьому, за умов введення індометацину відзначається підвищення активності каталази на 20 % ($p < 0,05$) в СОТнК порівняно з показниками контрольної групи, (табл. 3.4).

Отримані нами результати свідчать, що застосування НПЗП різного механізму дії, можуть призводити до порушення функціонування прооксидантної-антиоксидантної рівноваги у СОТнК. НПЗП викликали зростання вмісту ТБК-активних продуктів та активності МПО, паралельно компенсаторно підвищували

активність антиоксидантних ензимів у відповідь на надлишкове утворення активних форм кисню.

Таблиця 3.4

Вплив НПЗП різного механізму дії на процеси ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК (M±m, n=8)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6
Індометацин	219,1±14,2*	26,3±1,0	20,2±1,5*
Целекоксиб	222,9±13,2*	24,0±1,7	17,9±2,6
2A5DHT	215,4±18,9	26,0±0,5*	17,1±1,5

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$.

Відзначене зростання прозапальних маркерів у першу чергу пов'язано зі значенням продукції цитопротекторних ПГ, внаслідок чого порушується мікрогемодинаміка та слизовий бар'єр. Отже, введення різних за механізмом дії НПЗП викликало зміни активності NO-синтази, аргінази, вмісту газових медіаторів та процесів ліпопероксидації та виявляло їх роль у патогенезі запальних процесів у СОТнК.

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. Застосування неселективного блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацина проявляло ульцерогенну дію та супроводжувалось розвитком структурно-

геморагічних уражень в дистальному відділі тонкої кишки. Тоді як селективне блокування ЦОГ-2 целекоксибом та ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелом не викликало макроскопічних морфологічних змін у СОТнК.

2. Введення індометацину супроводжувалось зростанням активності iNOS, МПО, ензимів антиоксидантного захисту (каталази) та вмісту нітритів та нітратів; одночасно зменшенням активності аргінази у СОТнК та вмісту H_2S у плазмі крові.

3. Блокування ЦОГ-2 целекоксибом характеризувалось зростанням активності МПО, процесів ліпопероксидації та зниженням рівня H_2S у плазмі крові, порівняно з показниками тварин контрольної групи та не викликало виражених змін ензимів антиоксидантного захисту.

4. Інгібування активності ЦОГ-2/5-ЛОГ за умов введення сполуки 2A5DHT супроводжувалось зростанням активності МПО, СОД та концентрації нітритів та нітратів, одночасно зниженням концентрації H_2S порівняно з показниками контрольної групи тварин.

3.1.3. Дослідження впливу НПЗП на стан NO-синтазної системи, інтенсивність процесів ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК та вміст H_2S в плазмі крові за умов ВІС. Кишковий бар'єр формується за рахунок слизу, що синтезувався ентероцитами, міжклітинних взаємодій їх мембран та ряду імунокомпетентних клітин. Дисфункція цього бар'єру може бути викликана різними чинниками – стресом, ксенобіотиками, рядом лікарських препаратів (антибіотики, НПЗП тощо) і може призводити до розвитку прозапальних процесів у тонкій кишці. Підвищена проникність слизового бар'єру до ендотоксинів грамнегативних бактерій, може викликати розвиток запальної реакції в органах травної системи [68, 126, 166, 220, 231].

Як було описано вище (підрозділ 3.1.1) вплив п'ятигодинного ВІС не зумовлював макроскопічних ушкоджень у СОТнК, проте відзначалось різке зростання активності iNOS, що може свідчити про значні прозапальні зміни у епітеліоцитах та у подальшому може викликати утворення деструктивних

ушкоджень. У попередніх дослідженнях, порівнюючи ранні зміни активності різних прозапальних ензимів (iNOS, мієлопероксидаза, ЦОГ-2) у слизових оболонках органів травлення було відзначено, що зростання активності та експресії iNOS може служити найчутливішим маркером, що відображає ініціацію біохімічних змін, що призводять до розвитку деструктивних ушкоджень.

Гістологічними дослідженнями відзначено, що за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 відзначається порушується цілісність слизового бар'єру, ворсинки позбавлені епітелію. Як і за умов самотійної дії блокатора, так і за умов поєднаної дії інгібітора та стресу відзначається компресія ворсинок. На поверхні слизової оболонки візуалізувалась велика кількість слизистого секрету, що містив десквамовані стовпчасті ентероцити, келихоподібні клітини, поодинокі нейтрофіли, лімфоцити та еритроцити (рис. 3.11 – 2).

Інгібування ЦОГ-2 целекоксибом за умов стресу призводило до збільшення висоти ворсинок, на поверхні, яких відзначається велика кількість келихоподібних клітин, строма ворсинки з ознаками набряку та інфільтрована лейкоцитами. Також було встановлено збільшення висоти крипт (рис. 3.11 – 3).

За умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ зафіксована збільшена кількість слизистого секрету, строма ворсинки з ознаками набряку та інфільтровані лейкоцитами. Серед стовпчастих епітеліоцитів присутня велика кількість келихоподібних клітин. Також відзначається набряк власної пластинки (рис. 3.11 – 4).

Отже, в результаті гістологічних досліджень було встановлено, що тільки введення інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 посилює дію стресу, про що свідчить порушення цілісності слизового бар'єру, дисциркуляторні зміни судин слизового та підслизового прошарку та інфільтрація зони ушкоджень лейкоцитами. При цьому, потенціюючого ефекту за умов інгібування ЦОГ-2 целекоксибом та ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT на тлі ВІС не було виявлено, що свідчить про особливості дії катехоламінів за умов зниження продукції простагландинів та лейкотрієнів у тонкій кишці.

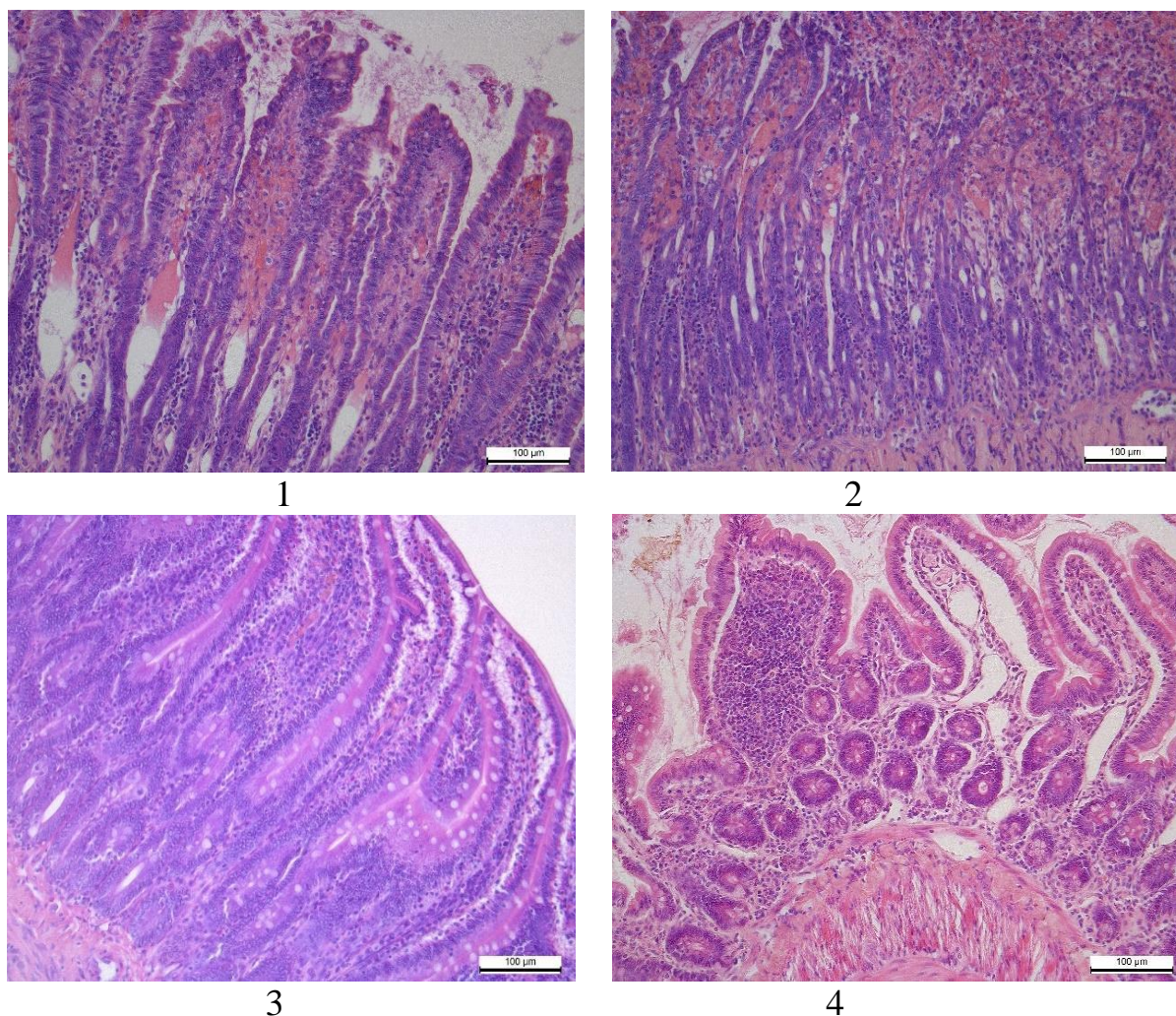


Рис. 3.11. Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов поєднаної дії стресу та НПЗП різного механізму дії. Гематоксилін та еозин x 200. 1 – дія ВІС протягом 5 год; 2 – ВІС + інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – ВІС + інгібітор ЦОГ-2; 4 – ВІС + інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ

Аналіз гістологічних зрізів тонкої кишки виявив морфометричні порушення, що проявлялись зниженням висоти ворсинок в порожньому відділі за умов поєднаної дії стресу та блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на 32,2 мкм ($p < 0,05$) та 51,8 мкм ($p < 0,05$), відповідно, порівняно з показниками ВІС (рис. 3.12 – А). Порівнюючи ширину ворсинок слизової оболонки порожнього відділу за умов дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на тлі ВІС з самостійною дією стресу, слід відзначити, що у тварин при блокуванні ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT досліджуванні показники були найвищими і сягали $45,8 \pm 2,1$ мкм ($p < 0,05$) (рис. 3.12 – В).

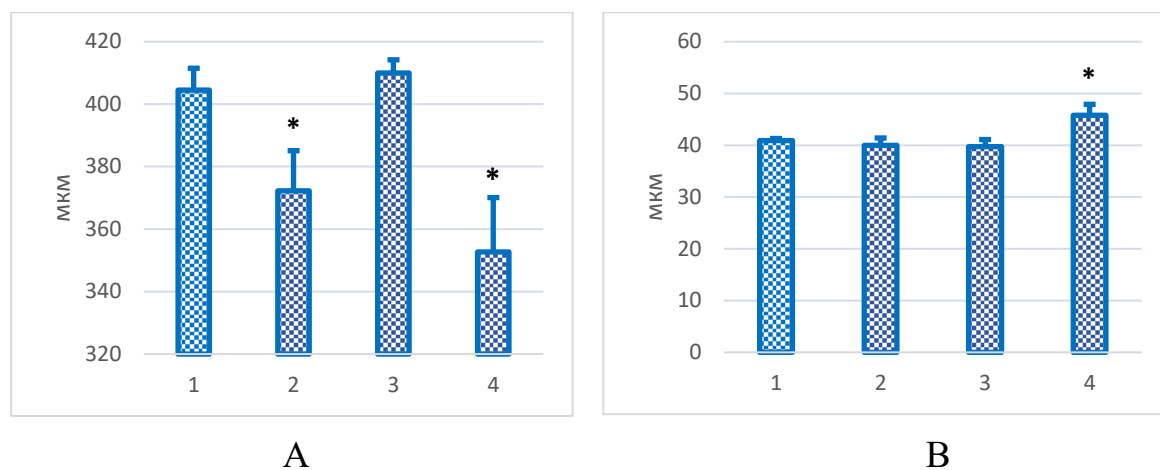


Рис. 3.12. Морфометричні показники слизової оболонки порожнього відділу кишки за умов поєднаної дії стресу та НПЗП різного механізму дії ($M \pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок. 1 – дія ВІС; 2 – ВІС + інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; 3 – ВІС + інгібітор ЦОГ-2; 4 – ВІС + інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ ; * – $p < 0,05$ порівняно з показниками ВІС

За умов поєднаної дії стресу та впливу неселективного блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацину була відзначена тенденція до зниження активності iNOS у СОТнК. Тоді як, інгібування активності ЦОГ-2 селективним блокатором целекоксибом на тлі ВІС у СОТнК викликало зниження активності iNOS на 21 % ($p < 0,05$), при цьому активність аргінази та cNOS незначно підвищувалась порівняно до показників при дії ВІС. При застосуванні інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ сполуки 2A5DHT за умов стресу також фіксувалось зниження активності iNOS на 23 % ($p < 0,05$), активність cNOS зростала на 46 % ($p < 0,05$) та аргінази в 2,1 рази ($p < 0,01$).

Відповідно до змін активності ізоформ NOS та аргінази в СОТнК були відзначенні зміни рівня L-аргініну в плазмі крові, як основного субстрату цих ензимів. Введення індометацину та целекоксибу за умов стресу збільшувало концентрацію амінокислоти на 57 % ($p < 0,05$) та 53 % ($p < 0,05$) відповідно, порівняно до показників самостійного ВІС, тоді як блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу призводило до зростання рівня L-аргініну більш ніж у два рази ($p < 0,01$) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Активність ізоформ NOS, аргінази в СОТнК та концентрація L-аргініну в плазмі крові за умов поєднаної дії стресу та впливу НПЗП різного механізму дії ($M \pm m$, $n=8$)

Група тварин	Активність iNOS, нмоль/хв×мг	Активність cNOS, нмоль/хв×мг	Аргіназа, мкмоль/хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
ВІС 5 год	188,9±9,8**	312,5±32,3**	0,07±0,01**	17,2±1,9**
ВІС + Індометацин	170,9±14,3	349,9±34,0	0,1±0,03	27,0±3,4 [#]
ВІС + Целекоксиб	149,8±15,8 [#]	373,8±36,6	0,11±0,03	26,3±2,4 [#]
ВІС + 2A5DHT	144,7±20,7 [#]	455,1±60,0 [#]	0,15±0,02 ^{##}	37,9±3,9 ^{##}

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: ** – $p < 0,01$; відносно показників ВІС: [#] – $p < 0,05$, ^{##} – $p < 0,01$.

В наших дослідженнях за умов ВІС спостерігали зростання метаболітів окиснення NO у СОТнК. За умов сумісного впливу ВІС та дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ відзначалось зниження рівня суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в СОТнК. Інгібування ЦОГ-2 знижувало рівень суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ на 35 % ($p < 0,05$), тоді як введення сполуки 2A5DHT спричиняло більш виражені зміни – вміст суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ знижувався на 42 % ($p < 0,01$), порівняно до показників самостійного ВІС. За умов поєднаної дії

стресу та інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 зміни концентрації NO_2^- та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в СОТнК не було відзначено порівняно з показниками ВІС (рис. 3.13).

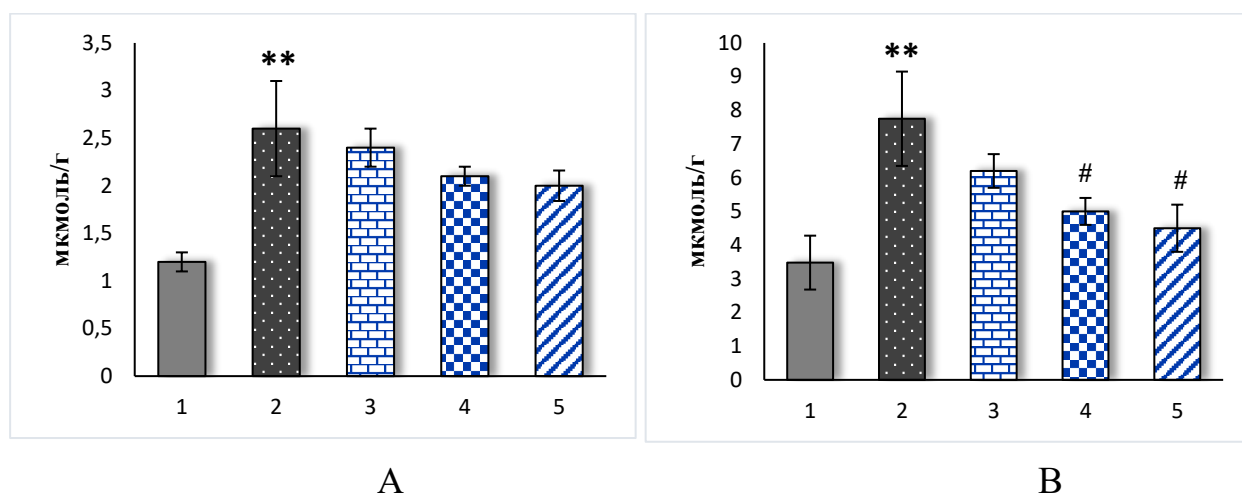


Рис. 3.13. Концентрація NO_2^- (А) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$). 1 – Контроль; 2 – ВІС; 3– Індометацин+ВІС; 3 – Целекоксиб+ВІС; 4 – Дарбуфелон+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; # – $p < 0,05$ порівняно з показниками ВІС

Отже, у разі введення інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 та індукції стресу зафіксовано високу активність індуцибельної ізоформи NO-синтази та пригнічення cNOS, причому на тлі стресу ми спостерігали аналогічну динаміку. Також відзначалась односпрямований вплив інгібіторів ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ щодо активності iNOS та було зафіксовано її зниження відносно показників стресу, тоді як значне зростання активності cNOS свідчило про ефективність впливу сполуки 2A5DHT. Усі досліджувані НПЗП підвищували активність аргінази в СОТнК та вміст L-аргініну в плазмі крові за умов ВІС, проте найбільш виражений ефект чинив інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ, натомість інгібітори ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2 мали менший вплив.

Як зазначалося в підрозділі 3.1.1 індукція стресу призводила до пригнічення біосинтезу H_2S в плазмі крові. Застосування НПЗП на тлі стресу не викликало достовірних змін рівня газового медіатора порівняно з показниками ВІС (рис. 3.14). Так, як H_2S відіграє важливу роль у регуляції кровотоку слизової оболонки органів

травної системи та адгезії лейкоцитів до ендотелію судин, то саме зниження його рівня за умов поєднаної дії стресу та НПЗП, служить одним з ключових факторів розвитку гастроінтестинальних уражень.

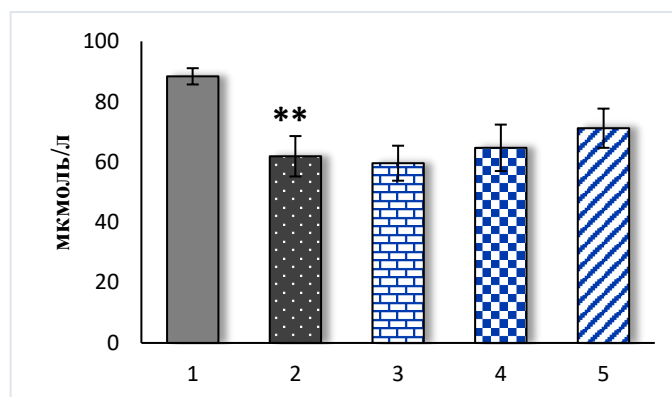


Рис. 3.14. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу НПЗП різного механізму дії на тлі стресу ($M \pm m$, $n=8$). 1 – Контроль; 2 – ВІС; 3– Індометацин+ВІС; 3 – Целекоксиб+ВІС; 4 – Дарбуфелон+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

Нагромадження ТБК-активних продуктів в СОТнК за умов ВІС свідчить про ініціацію утворення кисневих радикалів та ушкодження слизової оболонки. Індукція стресу та застосування інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ викликало зменшення утворення ТБК-активних продуктів на 18 % ($p < 0,05$) та на 14 % ($p < 0,05$) за умов інгібування ЦОГ-2 порівняно з показниками стресу. Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 за умов стресу характеризувалось незначним зменшенням концентрації ТБК-активних продуктів в СОТнК (табл. 3.6).

На відміну від стресу, введення НПЗП призвело до зростання активності ензимів антиоксидантного захисту. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином за умов ВІС сприяло підвищенню активності СОД на 25 % ($p < 0,05$) та каталази на 42 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками стресу. Введення інгібіторів ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу не викликало достовірних змін активності каталази в СОТнК. Тоді як активність СОД зростала за умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ на 36 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками ВІС (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Вплив НПЗП різного механізму дії за умов стресу на процеси ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК (M±m, n=8)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6
ВІС 5 год	261,0±16,0**	20,2±1,8*	15,7±2,9
ВІС + Індометацин	230,7±13,6	25,3±2,0 [#]	22,3±2,8 [#]
ВІС + Целекоксиб	226,2±7,2 [#]	23,2±2,1	18,2±4,8
ВІС + Дарбуфелон	215,7±10,9 [#]	27,5±1,0 ^{##}	18,6±2,4

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; відносно показників ВІС: [#] – $p < 0,05$, ^{##} – $p < 0,01$.

В результаті проведених нами досліджень відзначалось зниження активності МПО в СОТнК за умов поєднаного впливу стресу та НПЗП. За умов поєднаного впливу неселективного інгібітора ЦОГ індометацину та ВІС активність МПО збільшилась у гомогенатах СОТнК у 4 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з показниками контрольної групи тварин та на 15 % ($p > 0,05$) зменшилась у порівнянні з самостійною дією ВІС; за умов блокування ЦОГ-2 – на 43 % ($p < 0,01$) та при введенні інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ відзначається зниження більш ніж у два рази ($p < 0,01$), порівняно з показниками самостійної дії ВІС (рис. 3.15).

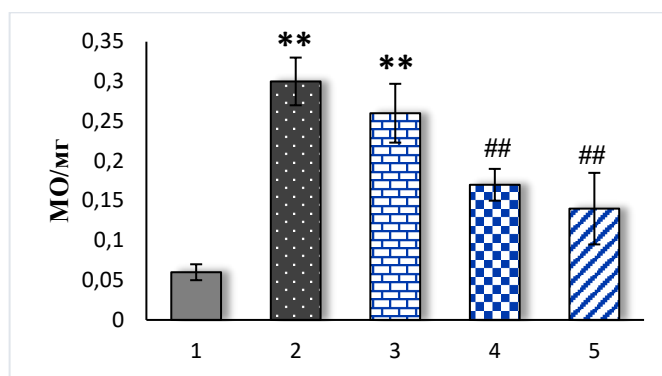


Рис. 3.15. Активність МПО в СОТнК ($M \pm m$, $n=8$). 1 – Контроль; 2 – ВІС; 3– Індометацин+ВІС; 4 – Целекоксиб+ВІС; 5 – Дарбуфелон+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи, ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками ВІС

Отже, за умов індукції стресу фіксувалось підвищення продуктів ліпопероксидації та порушення рівноваги про- і антиоксидантів. Застосування НПЗП сприяло зменшенню рівня ТБК-активних продуктів, блокування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ знижувало активність МПО в СОТнК, також відзначалось підвищення активності ензимів антиоксидантної системи.

Проведені нами дослідження впливу НПЗП різного механізму дії за умов стресу дозволили зробити наступні висновки:

1. Введення блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 за умов ВІС призводило до виражених деструктивних змін слизової оболонки порожньої кишки, що супроводжувалось руйнуванням слизового бар'єру, десквамацією поверхневого шару епітеліоцитів; інгібування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу не викликало макроскопічних ушкоджень СОТнК, проте було зафіксовано розвиток набряку за умов поєднаної дії ВІС та блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ.

2. Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином на тлі ВІС не викликало достовірних змін системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК, відзначалась тенденція до зниження H_2S в плазмі крові; активність ензимів СОД та каталази зростала, тоді як активність МПО та концентрація ТБК-активних продуктів знижувались.

3. Введення селективного блокатора ЦОГ-2 при моделюванні стресу супроводжувалось зниженням активності iNOS, МПО та вмісту ТБК-активних

продуктів та паралельно підвищенням вмісту L-аргініну в плазмі крові порівняно з показниками ВІС.

4. Біохімічні зміни при введенні блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ за умов стресу характеризувались більш вираженими змінами системи NO-синтаза/аргіназа, зниженням процесів ліпопероксидації, активності МПО та зростанням активності АОС у СОТнК. На відміну від інших НПЗП було відзначено зростання вмісту H_2S в плазмі крові. Більш виражена протизапальна дія інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ свідчить про важливе значення лейкотрієнів у процесах виразкоутворення.

Результати даного підрозділу опубліковані у наукових працях: [17, 29, 63, 117, 190].

3.2. Вплив H_2S -зв'язаного НПЗП на процеси цитопротекції та стан мікрофлори в СОТнК за умов стресу

3.2.1. NO-синтазна система, зміни вмісту NO, H_2S та активність ензимів антиоксидантного захисту за умов дії інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2. На сьогоднішній день є актуальним пошук та створення нових цитопротекторних препаратів, дія яких ґрунтується на вивільненні нітрогену оксиду або гідрогену сульфїду. Одним з таких напрямків є синтез гібридних сполук шляхом включення H_2S до субстанції НПЗП. АТВ-346 ([4-тіокарбамоїл-фенїл ефір 2-(6-метоксинафтален-2-їл)-пропіонової кислоти) є одним з таких нових засобів, основу якого являє напроксен сполучений з H_2S [110, 230].

В даній серії досліджень нами визначений ефект H_2S -зв'язаного напроксену на стан системи NO-синтаза/аргіназа та процеси ліпопероксидації у СОТнК щурів за умов одноразового введення у дозі 10 мг/кг, у порівнянні з контрольними тваринами та дією напроксену без H_2S .

Гістологічні дослідження свідчать, що блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном викликало збільшення кількості келихоподібних клітин у ворсинках та відзначено потовщення епітеліальної пластинки за рахунок збільшення продуктів секреторної діяльності келихоподібних клітин. В окремих ворсинках спостерігається набряк та

посилена інфільтрація лімфоцитами. Крипти не глибокі, в яких відзначається збільшення кількості келихоподібних клітин. Власна пластинка містить багато судин мікроциркуляторного русла та велику кількість клітинних елементів, в тому числі фіброblastів. Біля дна ворсинок спостерігається інфільтрація лімфоцитами (рис. 3.16 – 2).

За умов введення H_2S -вмісного напроксену ворсинки були різної висоти з ознаками набряку і з локальною десквамацією епітелію. Келихоподібні клітини в основному розміщені в нижній частині ворсинок. Крипти не глибокі, кількість келихоподібних клітин в окремих криптах відсутня, а в деяких відзначається їх невелика кількість. Також зафіксовано набряк власної пластинки, м'язова пластинка дезорганізована. Спостерігається локальне згрупування гладких міоцитів (рис. 3.16 – 3).

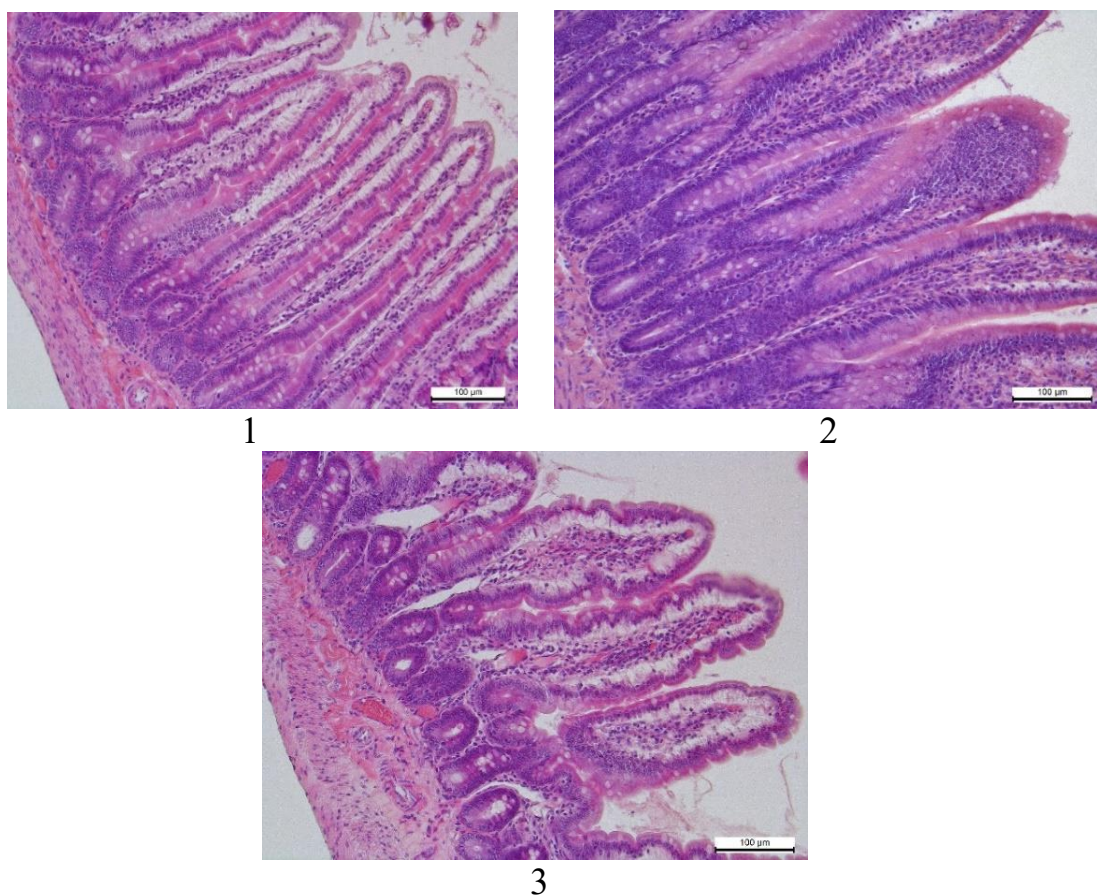


Рис. 3.16 Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов впливу НПЗП; Гематоксилін та еозин x 200; 1 – Контроль; 2 – напроксен; 3 – АТВ-346

В результаті морфометричних досліджень гістологічних зрізів слизової оболонки тонкої кишки виявили відмінності між дією напроксену та АТВ-346. Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксом призводило до збільшення висоти ворсинок на 36,4 мкм ($p < 0,01$), тоді як введення H_2S -зв'язаного НПЗП викликало протилежну дію та зниження висоти ворсинок на 21,2 мкм ($p < 0,05$), порівняно із показниками контролю та на 14 % ($p < 0,01$) порівняно з напроксом (рис. 3.17 – А).

Проте введення обох препаратів призводить до розвитку набряку слизової оболонки порожнього відділу тонкої кишки, що підтверджується збільшенням ширини ворсинок на 8,1 мкм ($p < 0,01$) за умов дії напроксену та на 6 мкм ($p < 0,05$) при дії АТВ-346, порівняно із показниками контрольної групи тварин (рис. 3.17 – В).

Зміни активності NO-синтазної системи за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксом спричиняло зростання активності iNOS вдвічі ($p < 0,01$) та пригнічення активності cNOS на 20 % ($p < 0,05$), порівняно із показниками контрольної групи. Також було відзначено зниження активності аргінази на 45 % ($p < 0,05$) у СОТнК та концентрації L-аргініну на 19 % ($p < 0,05$) в плазмі крові (табл. 4.1).

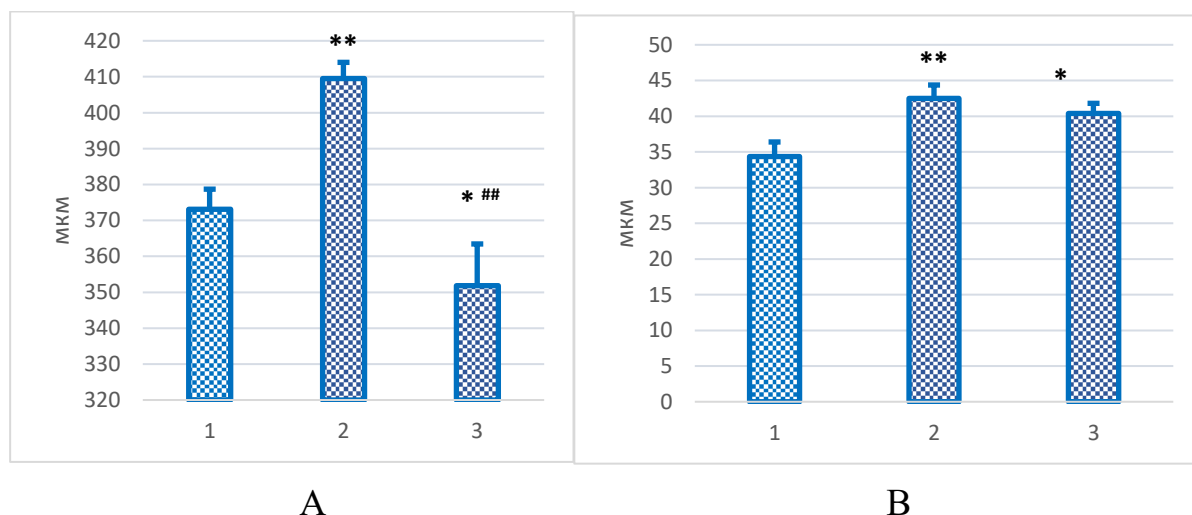


Рис. 3.17 Морфометричні показники слизової оболонки порожнього відділу кишки за умов дії НПЗП ($M \pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок; 1 – контроль; 2 – напроксен; 3 – АТВ-346; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контролю; ## - $p < 0,01$ порівняно з показниками напроксену

Застосування H₂S-вмісного НПЗП призвело до підвищення активності iNOS в 1,6 рази (p>0,05) та зниження cNOS на 17 % (p<0,05) у СОТнК у порівнянні з показниками контролю. В результаті досліджень було відзначено тенденцію до зниження активності аргінази в СОТнК та концентрації L-аргініну в плазмі крові за умов введення АТВ-346 порівняно з показниками контролю. Порівняно з дією напроксену H₂S-вмісний НПЗП підвищував активність аргінази на 63 % (p<0,05) та наближав її значення до показників норми (табл. 3.7).

Отже, зниження активності iNOS при дії H₂S-вмісного напроксену у порівнянні з напроксом без H₂S було біля 15 % (p>0,05), що супроводжувалось тенденцією до зростання cNOS.

Як зазначалося в підрозділі 3.1.2 застосування НПЗП різного механізму дії призводила до пригнічення біосинтезу та зниження вмісту H₂S в плазмі крові, при цьому блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином викликало найбільш виражені зміни. Отже, вплив H₂S за умов зниження синтезу ПГ викликає зміни у співвідношенні iNOS/cNOS, що призводить зменшення активності iNOS.

Таблиця 3.7

Стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та рівень L-аргініну в плазмі крові за умов дії НПЗП (M±m), n=8

Група тварин	Активність iNOS, нмоль/хв×мг	Активність cNOS, нмоль/хв×мг	Аргіназа, мкмоль/хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
Напроксен	126,2±10,9**	583,8±35,1*	0,11±0,02*	37,7±2,5*
АТВ-346	107,9±25,8	602,5±19,9*	0,18±0,02 [#]	40,5±3,2

Примітка: Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – p<0,05, ** – p<0,01; відносно показників напроксену: [#] – p<0,05.

Незважаючи на зменшення активності cNOS за умов введення напроксену, було відзначено значне зростання вмісту нітритів у СОТнК, що пов'язано з різким зростанням активності iNOS. Так, вміст NO_2^- зростав майже вдвічі ($p < 0,01$) порівняно із значеннями контрольної групи тварин (рис 3.18). При введенні АТВ-346 було зафіксовано зростання рівня NO_2^- на 41 % ($p < 0,05$) в СОТнК порівняно з контрольною групою тварин, однак вказані показники були нижчими у порівнянні з впливом напроксену ($p > 0,05$).

Отже, блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном супроводжувалось зростанням активності iNOS, вмісту метаболітів окиснення NO та одночасним зниженням активності cNOS, аргінази в СОТнК та концентрації L-аргініну в плазмі крові. Застосування H_2S -вмісного НПЗП характеризувалось менш вираженими, проте подібними змінами системи NO-синтаза/аргіназа, що свідчить про домінування базової молекули напроксену.

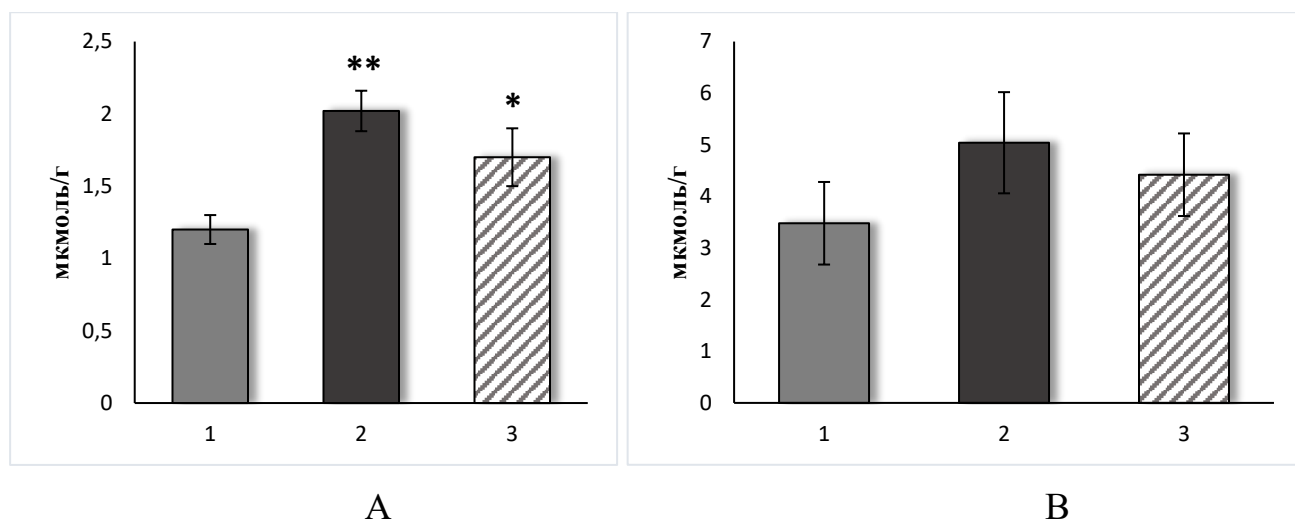


Рис. 3.18. Концентрація NO_2^- (А) та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – напроксен, 3 – АТВ-346; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

При блокуванні ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном відзначалось суттєве зменшення вмісту H_2S в плазмі крові, що свідчить про інгібуючий вплив НПЗП на ключові ферменти біосинтезу даного газового медіатора (рис 3.19). Вміст H_2S

за умов норми становив $88,4 \pm 2,7$ мкмоль/л, тоді як за умов введення напроксену він знижувався до $61,3 \pm 2,15$ ($p < 0,01$). Застосування АТВ-346 не викликало значних змін H_2S порівняно із показниками контрольної групи тварин, проте було зафіксовано зростання його вмісту порівняно із дією напроксену на 36 % ($p < 0,01$).

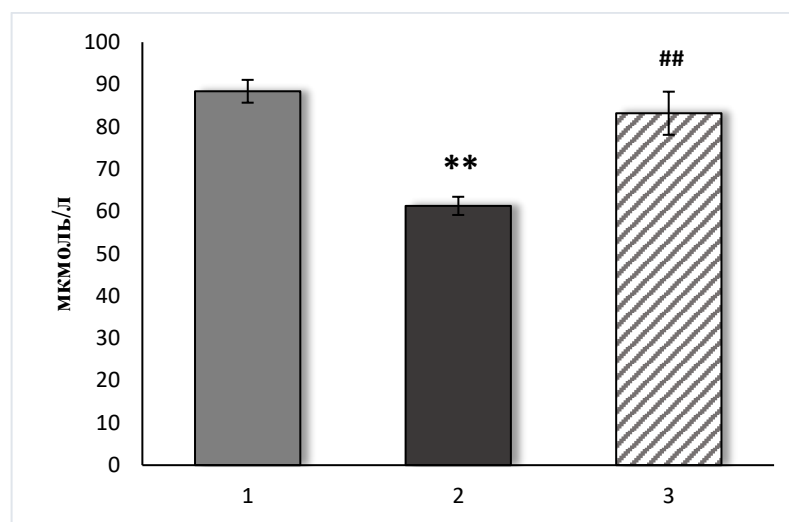


Рис. 3.19. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов норми та дії НПЗП ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – напроксен, 3 – АТВ-346; ** - $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи, ## - $p < 0,01$ порівняно з показниками напроксену

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 призводить до зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 17 % ($p < 0,05$) у СОТнК, що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ. В меншій мірі відзначалось зростання їх вмісту за умов введення H_2S -вмісного НПЗП (на 14 %, $p < 0,05$) порівняно із показниками контрольної групи тварин. Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном викликало зростання активності МПО більш ніж у два рази ($p < 0,01$), що свідчить про інфільтрацію та активацію нейтрофільних лейкоцитів СОТнК. Дія H_2S -вмісного НПЗП призводила до зростання активності МПО в СОТнК у 1,6 рази ($p < 0,01$), порівняно із показниками контрольної групи тварин та до зменшення на 32 % ($p < 0,05$), порівняно з впливом напроксену (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Активність ензимів антиоксидантного захисту та концентрація ТБК-активних продуктів за умов норми та впливу НПЗП у СОТнК (M±m, n=8)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг	МПО, МО/мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6	0,06±0,01
Напроксен	218,8±9,4*	24,5±2,5	18,3±1,0	0,15±0,02**
АТВ-346	213,5±5,6*	25,4±0,8	18,5±0,7	0,1±0,01***#

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; відносно показників напроксену: # – $p < 0,05$.

Отримані нами результати свідчать про те, що базова молекула напроксену відіграє ключову роль у реалізації блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та виникнення прозапальних процесів у СОТнК. Дія напроксену викликає порушення слизового бар'єру та розвиток нітрузо-оксидативного процесів у СОТнК. Модифікація напроксену шляхом приєднання H_2S зменшує прозапальні процеси у СОТнК про що свідчить інгібування активності iNOS, МПО та зниження процесів ПОЛ.

Результати досліджень дали можливість зробити наступні висновки:

1. Модифікований напроксен (АТВ-346) знижує структурно-морфологічні ушкодження СОТнК у порівнянні з напроксеном без H_2S . Були встановлені морфометричні відмінності СОТнК, що проявлялись збільшенням висоти ворсинок за умов дії напроксену та їх зменшення – при дії АТВ-346.

2. Введення блокатора ЦОГ напроксена призводило до порушення співвідношення iNOS/cNOS у сторону підвищення активності iNOS, також встановлено зростання активності МПО та інтенсифікація процесів ПОЛ, паралельно знижувалась активність аргінази в СОТнК та вмісту H_2S в плазмі крові.

3. Дія АТВ-346 викликає зменшення активності iNOS ($p > 0,05$), МПО ($p < 0,05$), вмісту нітрит аніону ($p > 0,05$) у СОТнК та підвищує вміст H_2S ($p < 0,05$) у плазмі крові порівняно із показниками напроксену.

3.2.2. Оцінка впливу H_2S -зв'язаного НПЗП на морфологічний стан та систему NOS/аргіназа, процеси ліпопероксидації, ензими АОЗ та мікрофлору тонкої кишки за умов стресу. Одним з важливих чинників НПЗП-індукованих ураження тонкої кишки є ушкоджувальний їх вплив на структуру мітохондрій епітеліальних клітин тонкої кишки, що призводить до зменшення продукції енергії та зростання утворення вільних радикалів, і як наслідок – ураження кишкового епітелію [159, 180, 242].

Як було описано вище (підрозділ 3.1.3), інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином за умов стресу призводило до розвитку уражень слизового бар'єру порожнього відділу тонкої кишки, що супроводжувалось зниженням вмісту H_2S в плазмі крові. Окрім протизапальних властивостей даного газового медіатора було встановлено, що H_2S може виступати в якості скавенджера вільних радикалів, що може відігравати вирішальну роль у попередженні побічної дії НПЗП. Однак, як впливає H_2S -вміщуючий напроксен на стан системи NO-синтаза/аргіназа та процеси ліпопероксидації на тлі стресу у тонкій кишці потребує поглибленого вивчення.

Інгібування ЦОГ напроксеном на тлі стресу не викликало розвитку видимих деструктивних змін СОТнК, проте при гістологічному аналізі відзначалися такі зміни – ворсинки були з ознаками набряку, їх строма була гомогенізована, біля епітеліальної пластинки спостерігалась лейкоцитарна інфільтрація. Відзначено в окремих ділянках відшарування епітелію (рис. 3.20 – 3). Введення АТВ-346 на тлі ВІС призводить до скупчення секреторних мас на поверхні ворсинок і в міжворсинчастому просторі. Окремі ворсинки мають ознаки набряку. Відзначається велика кількість келихоподібних клітин серед епітеліоцитів, проте в криптах їх мало або відсутні, також спостерігається їх міграція до поверхні

ворсинок. Наявний набряк власної пластинки, судини розширені. Між криптами і біля дна крипт спостерігається лімфоцитарна інфільтрація (рис. 3.20 – 4).

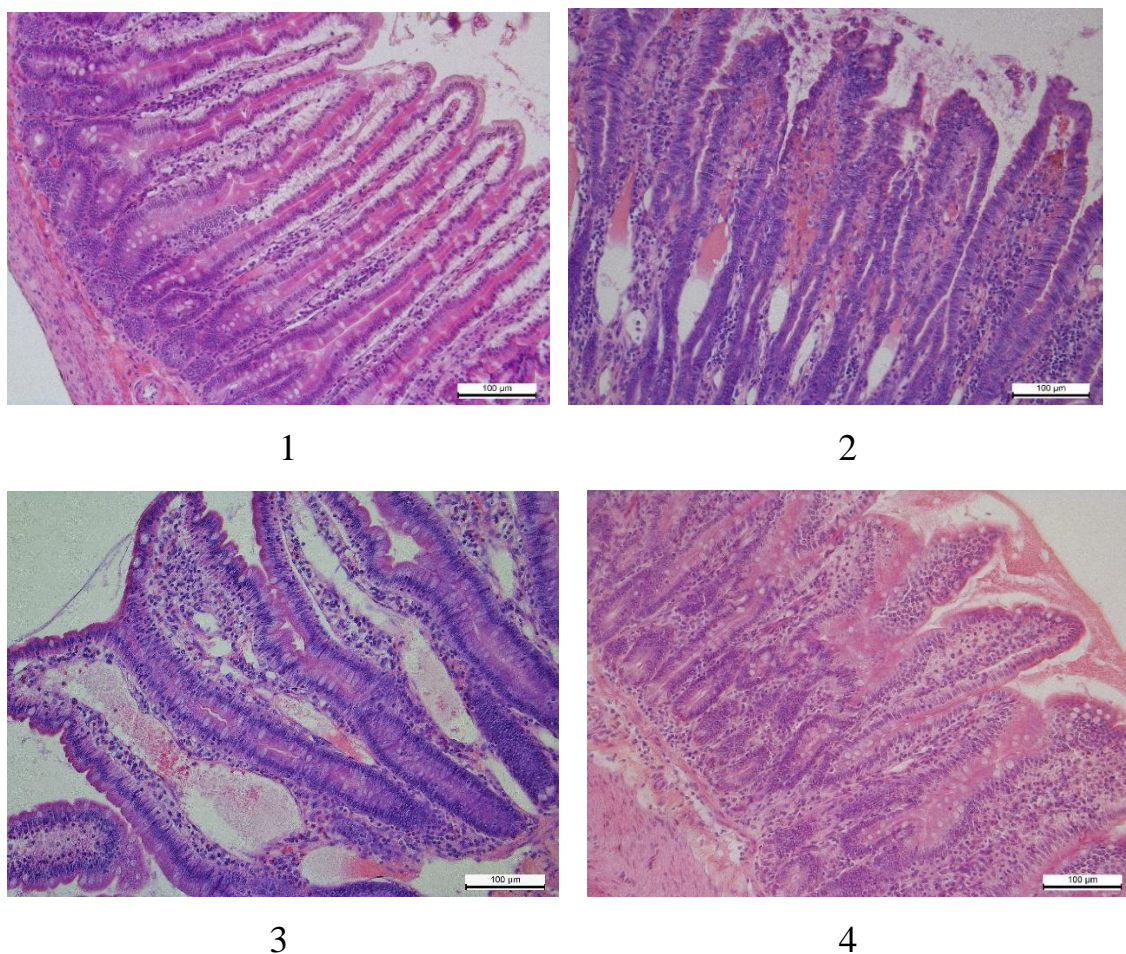


Рис. 3.20. Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов поєднаного впливу стресу та НПЗП; Гематоксилін та еозин x 200; 1 – Контроль; 2 – ВІС; 3 – ВІС+напроксен; 4 – ВІС+АТВ-346

У результаті морфометричного аналізу гістологічних зрізів тонкої кишки зафіксовано збільшення висоти ворсинок за умов поєднаної дії напроксену та стресу на 39,1 мкм ($p < 0,01$) порівняно із показниками контрольної групи тварин та незначне збільшення відносно самотійної дії ВІС. Введення АТВ-346 за умов стресу призводило до зменшення висоти ворсинок на 35,5 мкм ($p < 0,01$) порівняно з ВІС та на 43,3 мкм ($p < 0,01$) порівняно з показниками при поєднаній дії ВІС та напроксену (рис. 3.21 – А). Слід відзначити, що за умов самотійної дії інгібіторів (підрозділ 3.2.1) спостерігався аналогічний вплив на

морфологічний стан СОТнК тварин. Також зафіксовано збільшення ширини ворсинок за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі стресу порівняно зі самостійною дією ВІС та зменшення ширини за умов введення АТВ-346 на фоні стресу порівняно з показниками поєднаної дії ВІС та напроксену (рис. 3.21 – В).

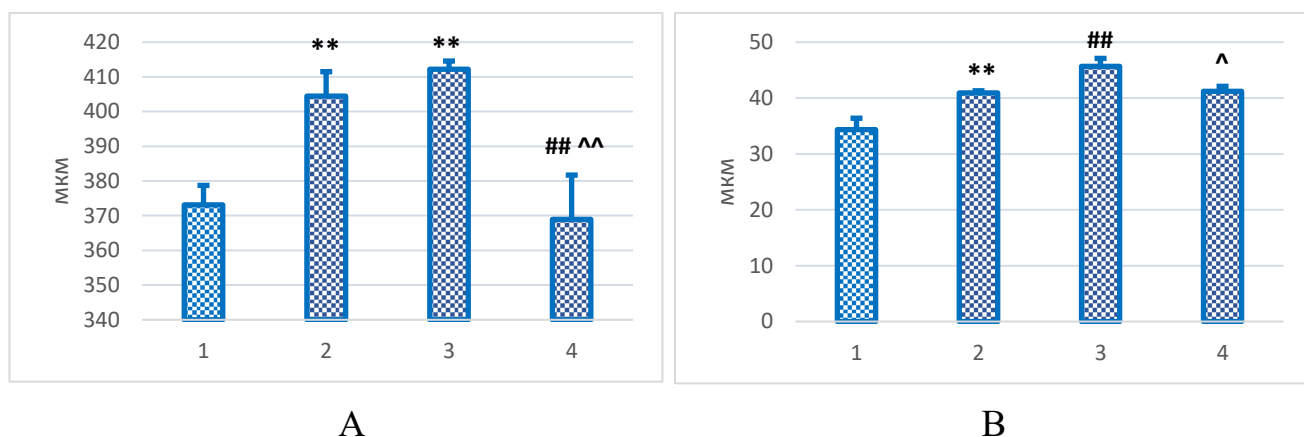


Рис. 3.21 Морфометричні показники слизової оболонки порожнього відділу кишки за умов дії НПЗП при стрес-індукованих змінах ($M \pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок; 1 – Контроль, 2 – ВІС, 3– Напроксен+ВІС, 4 – АТВ-346+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контролю; ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками самостійного ВІС; ^ – $p < 0,05$ у порівнянні з показниками при поєднаній дії ВІС та напроксену

Введення напроксену за умов стресу призводило до зниження активності iNOS на 18 % ($p < 0,05$), паралельно було відзначено несуттєве збільшення активності sNOS порівняно з показниками самостійного ВІС та достовірне зниження (в 2,2 рази, $p < 0,01$) порівняно до показників контрольної групи тварин. Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном за умов стрес-індукованих змін призводило до підвищення вмісту L-аргініну в плазмі крові (в 1,75 рази, $p < 0,01$), порівняно до показників самостійної дії ВІС. Введення АТВ-346 на тлі стресу викликало зниження активності iNOS на 21 % ($p < 0,05$), паралельно збільшувалась активність аргінази на 57 % ($p < 0,01$) в СОТнК, порівняно з показниками ВІС. Також було відзначено, що введення H_2S -вмісного НПЗП за умов ВІС призводить

до збільшення вмісту L-аргініну в плазмі крові в 2,1 рази ($p < 0,01$), порівняно з показниками стресу (табл. 4.3).

Таблиця 3.9

Вплив НПЗП на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та рівень L-аргініну в плазмі крові за умов стрес-індукованих змін ($M \pm m$), $n=8$

Група тварин	Активність iNOS, нмоль/хв×мг	Активність cNOS, нмоль/хв×мг	Аргіназа, мкмоль/хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
ВІС	188,9±9,8**	312,5±32,3**	0,07±0,01**	17,2±1,9**
ВІС + Напроксен	153,9±11,3 [#]	327,5±27,8**	0,09±0,01	30,1±3,8 ^{##}
ВІС+АТВ-346	148,8±16,3 [#]	364,3±34,9**	0,11±0,01 ^{##}	36,9±2,4 ^{##}

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: ** – $p < 0,01$; відносно показників ВІС: [#] – $p < 0,05$, ^{##} – $p < 0,01$.

Введення неселективного блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксену на тлі ВІС супроводжувалось тенденцією до зниження метаболітів NO (нітритів та нітратів) у СОТнК порівняно з показниками стресу; тоді як порівнюючи з показниками контрольної групи тварин відзначається збільшення вмісту NO_2^- та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ майже в два рази ($p < 0,01$). Одноразове введення АТВ-346 на тлі ВІС знижувало суму $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ на 30 % ($p < 0,05$) у гомогенатах СОТнК тварин порівняно з показниками самотійного впливу ВІС (рис. 3.22).

Оцінюючи показники системи NO-синтаза/аргіназа за умов дії H_2S -вмісного НПЗП та напроксену на тлі стресу то виражених їх змін не виявлено, що може свідчити про домінуючу роль базової субстанції АТВ-346 – напроксену.

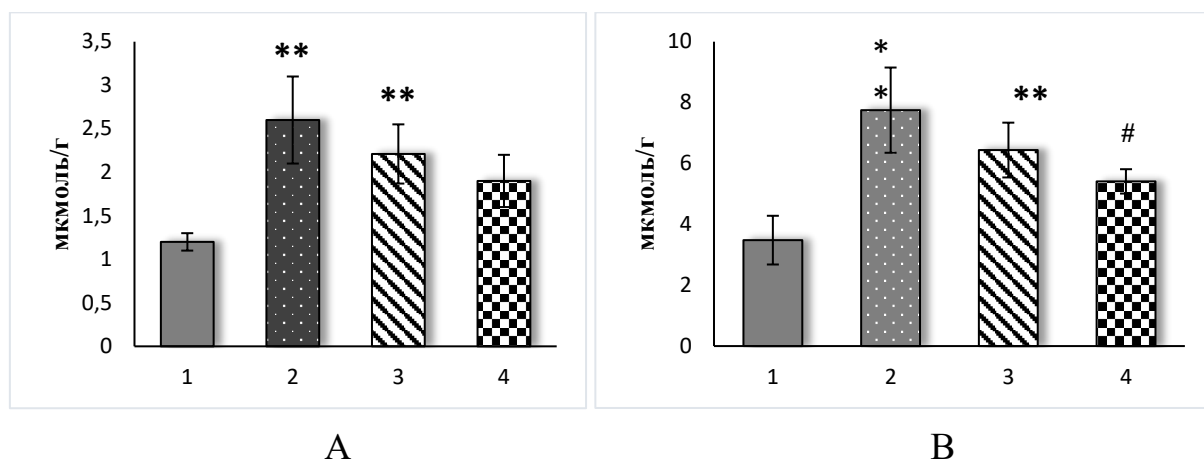


Рис. 3.22. Концентрація NO_2^- (A) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (B) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – ВІС, 3– Напроксен+ВІС, 4 – АТВ-346+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; # – $p < 0,05$ порівняно з показниками ВІС

Вміст H_2S в плазмі крові за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі стресу знижувався на 24 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками контрольної групи тварин та майже не відрізнявся від показників самостійного впливу ВІС. Аналогічні зміни вмісту H_2S спостерігались за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином, що підтверджує пригнічувальний вплив НПЗП на каталітичну активність ферментів його біосинтезу (рис. 3.23).

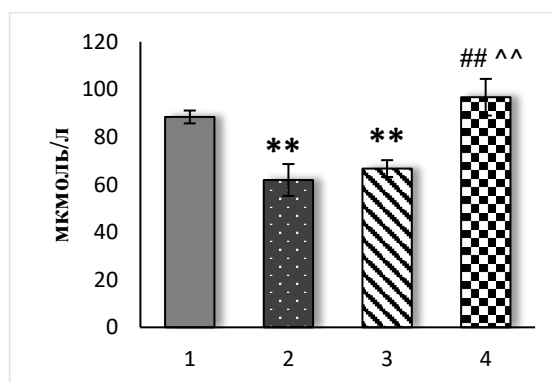


Рис. 3.23. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу НПЗП на тлі стресу ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – ВІС, 3– Напроксен+ВІС, 4 – АТВ-346+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками ВІС, ^^ – $p < 0,01$ порівняно з показниками при поєднаній дії ВІС та напроксену

Введення АТВ-346 за умов ВІС викликав достовірне підвищення рівня H_2S в крові на 56 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками ВІС та на 44 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками комбінованої дії напроксену та ВІС. Отже, використання H_2S -вмісного НПЗП призводить до відновлення вмісту H_2S в плазмі крові до показників групи контролю, що може відігравати потенційну роль у зменшенні цитотоксичного впливу НПЗП.

Неселективне інгібування ЦОГ напроксеном на тлі ВІС призводить до зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 17 % ($p < 0,05$) у гомогенатах СОТнК порівняно з показниками стресу; зміни антиоксидантної системи супроводжуються достовірним підвищенням активності каталази на 32 % ($p < 0,05$) (табл. 3.10). Пригнічення активності СОД за умов одночасної дії стресу та НПЗП може сприяти реакції супероксиданіону та NO з утворенням пероксинітриту та розвитку ентеропатії.

Таблиця 3.10

Активність ензимів антиоксидантного захисту та концентрація ТБК-активних продуктів за умов поєднаної дії НПЗП на ВІС у СОТнК ($M \pm m$, $n=8$)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6
ВІС 5 год	268,4±30,7**	20,2±1,8*	15,7±2,9
ВІС + Напроксен	221,0±7,8 [#]	22,9±2,8	20,8±0,9 [#]
ВІС+АТВ-346	217,0±7,2 [#]	25,0±1,3 [#]	19,5±0,6 [#]

Примітка: Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; відносно показників ВІС: [#] – $p < 0,05$.

Введення H_2S -вмісного НПЗП за умов стрес-індукованих змін викликало достовірне зменшення ТБК-активних продуктів на 19 % ($p < 0,05$) та підвищення активності СОД та каталази на 24 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками самостійної дії ВІС. Проте при порівнянні дії двох НПЗП за умов ВІС достовірних змін не було встановлено.

Порушення слизового бар'єру за умов поєднаної дії напроксену та стресу супроводжувалось також зростанням активності мієлопероксидази у 4,5 рази ($p < 0,01$) в гомогенатах СОТнК, порівняно з показниками контрольної групи тварин. Аналогічні зміни були відзначені за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином на тлі ВІС. Підвищення активності МПО свідчить про індукцію нейтрофільної інфільтрації зони ушкодження. Введення АТВ-346 за умов стресу викликало значне зниження активності МПО – майже вдвічі ($p < 0,01$) порівняно з показниками ВІС та 1,6 рази ($p < 0,05$) порівняно з показниками поєднаної дії ВІС та напроксену (рис. 3.24).

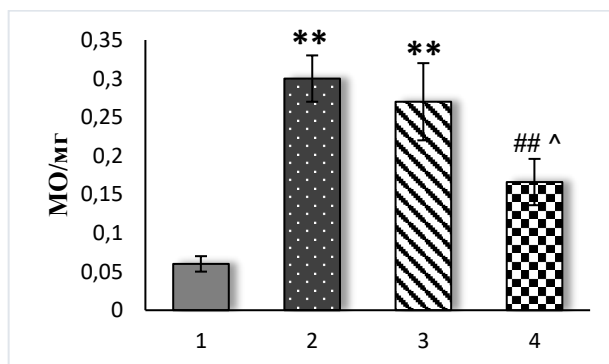


Рис. 3.24 Активність МПО в СОТнК за умов комбінованої дії НПЗП та ВІС ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – ВІС, 3 – Напроксен+ВІС, 4 – АТВ-346+ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками ВІС, ^ – $p < 0,05$ порівняно з показниками при поєднаній дії ВІС та напроксену

У тварин за умов введення АТВ-346 на тлі ВІС відзначався обернений кореляційний зв'язок між рівнем H_2S та активністю МПО ($r=0,469$, $p < 0,05$), що свідчить про вплив H_2S на процеси інфільтрації СОТнК нейтрофілами та моноцитами та рівень їх активності.

Враховуючи те, що НПЗП діють також на стан мікробіоценозу, викликаючи зростання патогенних штамів у СОТнК, нами було визначено стан біоценозу за умов дії стресу та його поєднаного впливу з напроксеном.

У тварин контрольної групи відзначений неоднаковий вміст лактобактерій та біфідобактерій у різних відділах тонкої кишки – більша кількість лактобактерій була у дистальному відділі тонкої кишки $(2,5 \pm 0,21) \cdot 10^4$ КУО/г. Згідно даних літератури, зростання нормосимбіонтної мікрофлори може попереджати висхідній транслокації умовно-патогенної мікрофлори з товстої кишки у верхні відділи органів травлення [6]. З боку ентерококів не зафіксовано кількісних змін та відзначалась однакова кількість як в проксимальному, так і дистальному відділах тонкої кишки. Також були встановлені зміни кількості ешерихій та клостридій та відзначалось їх зростання в клубовому відділі (табл. 3.11).

Встановлено, що вплив ВІС призводив до зростання біфідобактерій як у проксимальному, так і дистальному відділах тонкої кишки. Показана тенденція до зниження кількості лактобактерій у дванадцятипалій кишці за умов стресу. У клубовому відділі тонкої кишки за умов дії ВІС відзначали кількісні зміни умовно-патогенної мікрофлори та встановлено достовірне зростання кількості *Escherichia coli* з $(1,0 \pm 0,23) \cdot 10^3$ до $(1,0 \pm 0,29) \cdot 10^4$ КУО/г ($p < 0,05$) та клостридій до $(1,0 \pm 0,24) \cdot 10^4$ проти $(6,3 \pm 0,20) \cdot 10^3$ КУО/г ($p < 0,05$); тоді як достовірних змін кількості ентерококів не було виявлено.

За умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на фоні стресу наявна тенденція до збільшення числа ентерококів в проксимальному та дистальному відділі тонкої кишки на тлі відсутності кишкової палички в дванадцятипалій кишці порівняно з показниками ВІС. Слід відзначити, що дія інгібітора призводить до зменшення числа ешерихій в клубовій кишці до $(1,0 \pm 0,16) \cdot 10^2$ КУО/г ($p < 0,05$) та збільшення клостридіальної мікрофлори в дванадцятипалій кишці ($p < 0,05$).

Нещодавніми дослідженнями було встановлено, що зміна проникності слизового бар'єру кишки до мікрофлори за умов стресу посилює розвиток уражень тонкої кишки за умов дії НПЗП [196, 220, 231].

Таблиця 3.11

Розподіл основних груп бактерійних симбіонтів (КУО/г) у порожнині тонкої кишки за умов поєднаного впливу ВІС та НПЗП (M±m, n=8)

Схема досліджу	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	<i>Clostridium spp.</i>
Контроль					
Дванадцятипала кишка	(6,3±0,21) ·10 ⁴	(1,0±0,14) ·10 ²	(2,5±0,25) ·10 ³	(1,0±0,2) ·10 ³	(5,0±0,19) ·10 ²
Клубова кишка	(6,3±0,25) ·10 ⁴	(1,0±0,23) ·10 ³	(2,5±0,21) ·10 ⁴	(6,3±0,19) ·10 ³	(6,3±0,20) ·10 ³
ВІС тривалістю 5 год					
Дванадцятипала кишка	(1,0±0,32) ·10 ⁴	0	(1,6±0,20) ·10 ³	(1,26±0,25) ·10 ^{4*}	(6,3±0,16) ·10 ²
Клубова кишка	(3,2±0,32) ·10 ⁴	(1,0±0,29) ·10 ^{4*}	(3,2±0,40) ·10 ⁴	(1,0±0,33) ·10 ^{5*}	(1,0±0,24) ·10 ^{4*}
Напроксен + ВІС					
Дванадцятипала кишка	(4,0±0,33) ·10 ⁴	0	(1,0±0,22) ·10 ^{4#}	(1,6±0,32) ·10 ⁴	(1,0±0,22) ·10 ³
Клубова кишка	(6,3±0,32) ·10 ⁴	(1,0±0,16) ·10 ^{2#}	(1,0±0,26) ·10 ⁴	(1,6±0,32) ·10 ⁵	(1,0±0,24) ·10 ⁴

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – p<0,05; відносно показників ВІС: # – p<0,05.

До бактерій, що відіграють ключову роль у розвитку НПЗП-індукованих ентеропатій відносять *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides* та *Escherichia coli*. Важливість грамнегативних бактерій у патогенезі НПЗП-індукованих ентеропатії може пояснюватися продукцією ними ліпополісахариду (ЛПС), що посилює запалення та ураження слизової оболонки.

Проведені дослідження впливу НПЗП за умов стресу дозволили зробити наступні висновки:

1. Введення напроксену та АТВ-346 за умов стресу не викликало макроскопічних змін, проте гістологічні дослідження виявили розвиток набряку у СОТнК.

2. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксом на тлі ВІС викликало зниження активності iNOS, вмісту ТБК-активних продуктів у СОТнК та H_2S в плазмі крові та паралельно відзначалось підвищення активності cNOS, аргінази, каталази в слизовій оболонці. Дослідження мікрофлори порожнини тонкої кишки дозволила встановити кількісні зміни, що характеризувались зростанням числа умовно-патогенної мікрофлори як за умов самотійного ВІС, так і при поєднаній дії НПЗП та стресу.

3. Введення АТВ-346 за умов стресу знижувало процеси ліпопероксидації, активність МПО та викликало зростання АОС у гомогенатах СОТнК та вміст H_2S та L-аргініну в плазмі крові. Проте зміни системи NO-синтаза/аргіназа достовірно не відрізнялись від показників впливу напроксену на тлі ВІС.

3.2.3. Стан NO-синтазної системи, інтенсивність процесів ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК та вміст H_2S у плазмі крові за умов інгібування ЦОГ на тлі АІС. Отримані нами результати свідчать (підрозділ 3.1.1), що дія стресу різного походження призводить до розвитку біохімічних змін систем синтезу газових медіаторів (NO та H_2S). Слід відзначити, що введення інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 на тлі ВІС призводило до порушення цілісності слизового бар'єру тонкої кишки, тоді як АТВ-346 проявляв цитопротекторний вплив. Дослідження ролі NO-синтазної/аргіназної системи та вмісту H_2S у біохімічних механізмах АІС у взаємозв'язку з інгібуванням систем ЦОГ/ПГ в СОТнК потребує більш детального вивчення. Інформація щодо впливу H_2S -вмісного НПЗП за умов введення адреналіну може відігравати важливу роль у розумінні ролі газових медіаторів у зниженні побічної дії НПЗП у слизових органах травлення на тлі зростання рівня стрес-гормонів.

Раніше були наведені результати щодо впливу різного механізму дії блокаторів ЦОГ на макроскопічний та гістологічний стан слизової оболонки порожньої кишки. Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксом на тлі АІС супроводжувалося дезорганізацією клітинного епітелію, були відсутні клітини з облямівкою, ворсинки були покриті секретом келихоподібних клітин. У стромі

ворсинок спостерігається набряк, інфільтрація лейкоцитами, за рахунок набряку були звуженими міжворсинчасті простори та збільшилась кількість келихоподібних клітин. Спостерігалась проліферація епітелію крипт (рис. 3.25 – 3).

За умов введення H_2S -вмісного НПЗП на тлі стресу відзначається десквамація епітелію в окремих ворсинках. Спостерігається збільшення кількості келихоподібних клітин. На поверхні слизової оболонки візуалізувалась надмірна кількість слизистого секрету, що містив десквамовані стовпчасті ентероцити, келихоподібні клітини, лейкоцити. Відзначали набряк сполучної тканини слизової оболонки та підслизового прошарку. Крипти глибокі, фіксується зменшення кількості келихоподібних клітин (рис. 3.25 – 4).

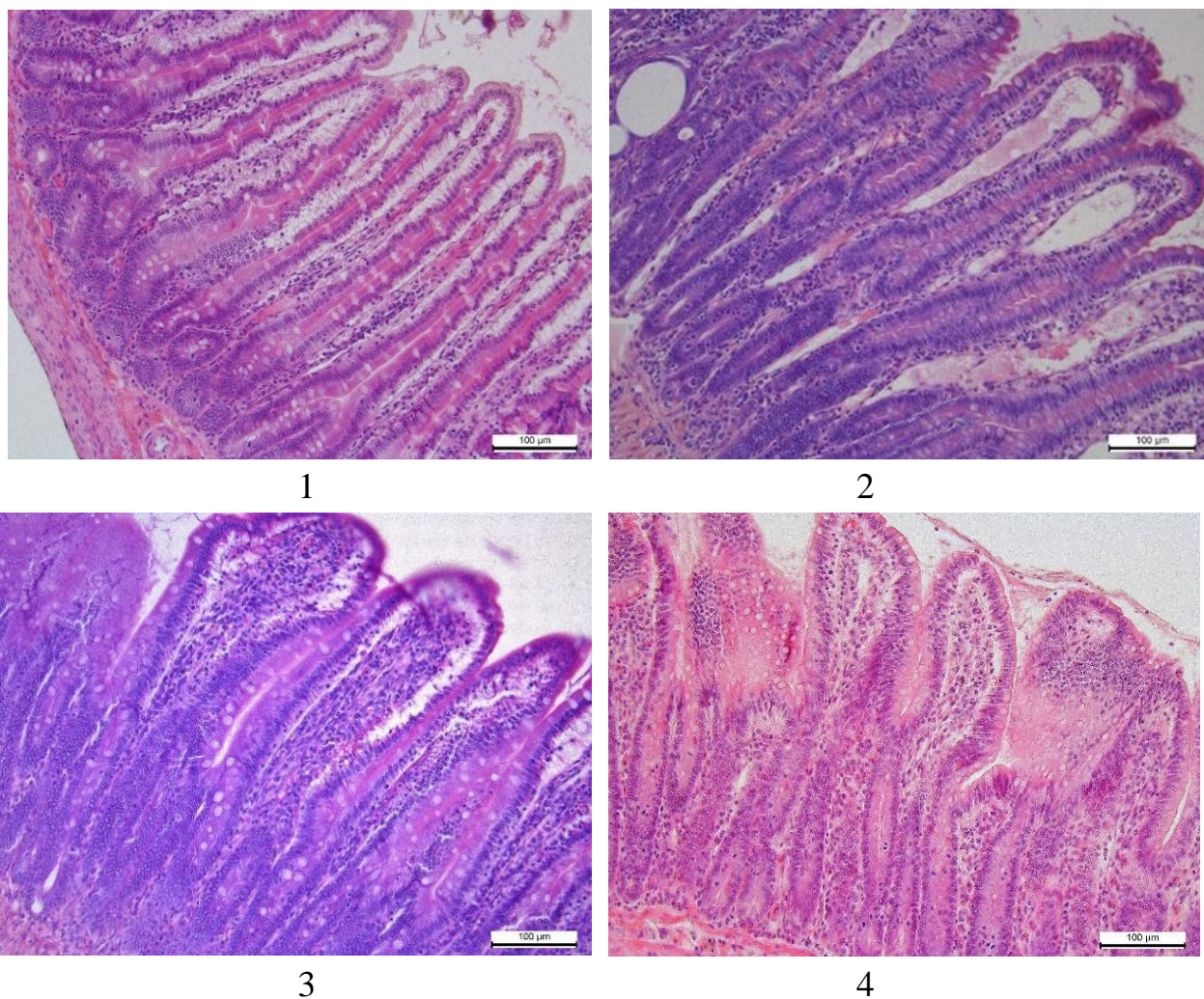


Рис. 3.25 Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов поєднаного впливу стресу та НПЗП. Гематоксилін та еозин x 200. 1 – Контроль; 2 – АІС, 3 – АІС+напроксен, 4 – АІС+АТВ-346

Отже, як при інгібуванні ЦОГ-1/ЦОГ-2 як напроксеном, так і АТВ-346 на тлі стресу цілісність слизового бар'єру була збережена, дисциркуляторні зміни судин зменшились, проте відзначалась значна інфільтрація лейкоцитами та розвиток набряку строми ворсинок СОТнК.

В результаті морфометричних досліджень було встановлено збільшення висоти ворсинок на 30,4 мкм ($p < 0,01$) за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі АІС порівняно з показниками контрольної групи тварин та був відзначений напрям до зниження порівняно з показниками АІС. Введення АТВ-346 за умов стресу викликало зниження висоти ворсинок на 37,1 мкм ($p < 0,01$) порівняно з показниками АІС та на 31,3 мкм ($p < 0,01$) порівняно з показниками поєднаної дії напроксену та АІС, відзначалось наближення цих значень до показників контрольної групи тварин (рис. 3.26 – А). У результаті проведених досліджень встановлено, що вплив напроксену на тлі АІС викликав збільшення ширини ворсинок до $43,9 \pm 3,0$ мкм ($p < 0,05$), порівняно з показниками АІС. За умов дії АТВ-346 на тлі АІС спостерігалась тенденція до підвищення ширини ворсинок порівняно з показниками АІС (рис. 3.26 – В).

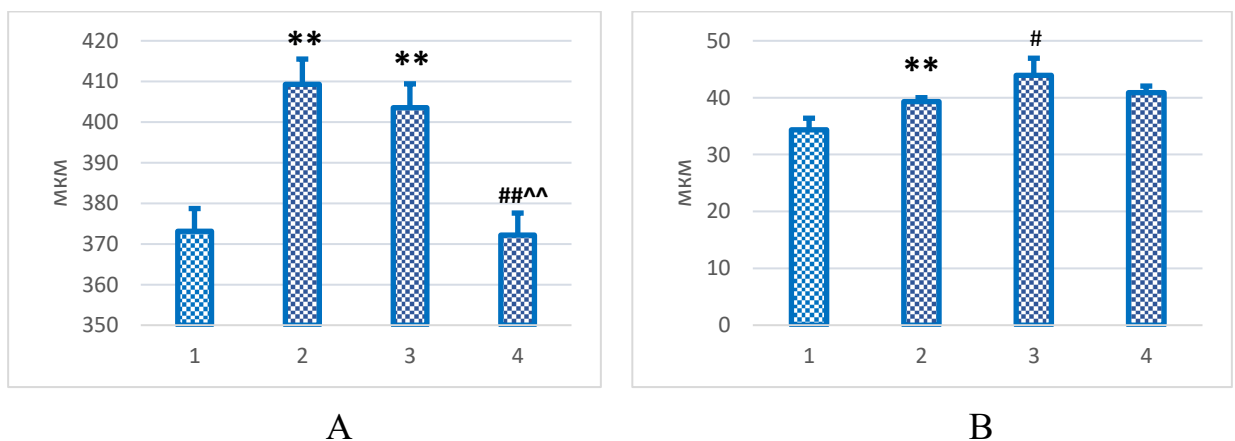


Рис. 3.26. Морфометричні показники слизової оболонки порожнього відділу кишки за умов дії НПЗП при адреналін-індукованих змінах ($M \pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок; 1 – Контроль, 2 – АІС, 3– Напроксен+АІС, 4 – АТВ-346+АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контролю, # – $p < 0,05$, ### – $p < 0,01$ порівняно з показниками АІС, ^^ – $p < 0,01$ у порівнянні з показниками при поєднаній дії АІС та напроксену

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксомом за умов АІС викликало зниження активності сNOS на 27 % ($p < 0,01$), тоді як активність іNOS, аргінази в СОТнК та вміст L-аргініну в плазмі крові достовірно не змінювались порівняно з показниками стресу. При блокуванні ЦОГ-1/ЦОГ-2 АТВ-346 на тлі АІС відзначено зниження активності іNOS на 36 % ($p < 0,05$), активність сNOS зменшилась на 18 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками АІС. Зміни системи NO-синтаза/аргіназа за умов дії АТВ-346 на тлі стресу порівнюючи з показниками поєднаної дії АІС та напроксену виявили зменшення активності іNOS на 17 % ($p < 0,05$), збільшення активності сNOS на 13 % ($p < 0,05$), аргінази на 54 % ($p < 0,01$) в гомогенатах СОТнК. Також відзначалось достовірно збільшення вмісту L-аргініну в плазмі крові за умов поєднаної дії АТВ-346 та АІС на 14 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками АІС та на 18 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками напроксену на тлі АІС (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Вплив НПЗП на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та рівень L-аргініну в плазмі крові за умов адреналін-індукованих змін ($M \pm m$), $n=8$

Група тварин	Активність іNOS (нмоль/хв×мг)	Активність сNOS (нмоль/хв×мг)	Аргіназа мкмоль/хв×мг	L-аргінін мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
АІС	176,5±29,2**	428,0±38,0**	0,16±0,04	37,5±2,2*
АІС + Напроксен	137,2±15,6	310,7±11,5 ^{##}	0,11±0,02	36,3±1,9
АІС+АТВ-346	113,0±10,5 ^{#^}	350,3±10,8 ^{#^}	0,17±0,02 ^{^^}	43,0 ±3,4 ^{#^^}

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; відносно показників АІС: # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$; відносно показників поєднаної дії АІС та напроксену: ^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$.

Відповідно до зниження активності iNOS за умов дії інгібіторів ЦОГ вміст метаболітів NO у гомогенатах СОТнК знижувався. Було зафіксовано зменшення вмісту NO_2^- на 22 % ($p < 0,01$) та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ на 36 % ($p < 0,01$) за умов дії напроксену на тлі АІС порівняно з показниками стресу. При дії АТВ-346 за умов впливу АІС вміст NO_2^- знижувався на 19 % ($p < 0,05$), сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ – на 38 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками АІС, тоді як порівнюючи з показниками поєднаної дії напроксену та АІС достовірних змін не відзначалось (рис. 3.27).

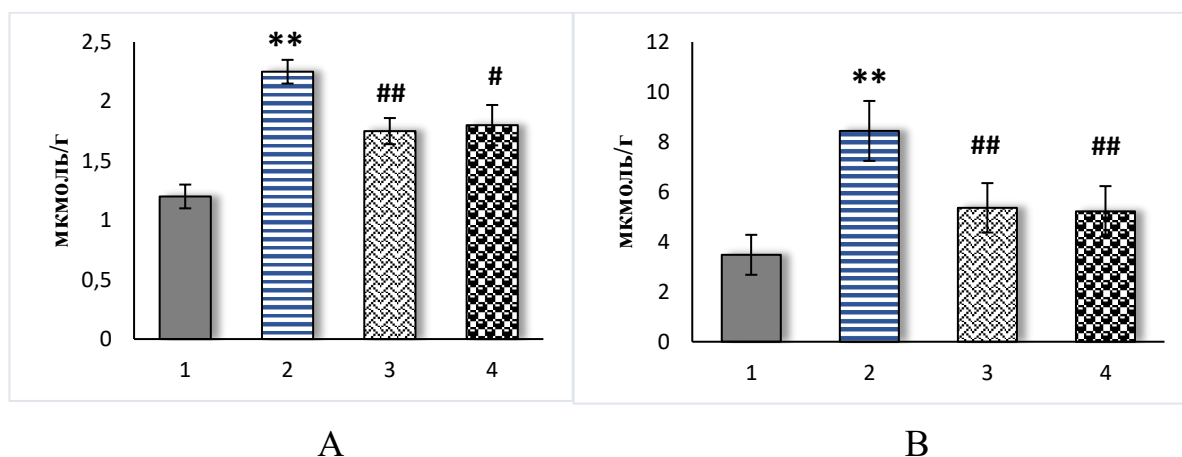


Рис. 3.27. Концентрація NO_2^- (А) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – АІС, 3 – Напроксен+АІС, 4 – АТВ-346+АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками АІС

Отже, блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном та АТВ-346 на тлі АІС призводило до зниження рівня активності iNOS у СОТнК у порівнянні з ізольованим впливом АІС. Це обумовлено тим, що між системами ЦОГ/ПГ та NOS/NO існують тісні взаємозв'язки: NO може безпосередньо стимулювати експресію ЦОГ та біосинтез ПГ [205]. З іншого боку простагландини регулюють активність NOS. У зв'язку з цим, блокування активності ЦОГ призводило до зниження активності NOS (у першу чергу, iNOS) та зменшувало продукцію NO. Проте слід відзначити достовірні зміни системи NO-синтаза/аргіназа за умов дії АТВ-346 на тлі АІС порівняно з показниками поєднаної дії напроксену та АІС, що проявлялись

зниженням активності iNOS та паралельним підвищенням активності cNOS та аргінази в СОТнК та вмісту L-аргініну в плазмі крові.

Поєднана дія напроксену та АІС викликала зниження вмісту H_2S в плазмі крові на 22% ($p < 0,01$) порівняно з показниками контрольної групи тварин, що підтверджує пригнічувальну дію НПЗП на систему синтезу газового медіатора. Введення H_2S -вмісного НПЗП призводило до збільшення вмісту H_2S в плазмі крові на 24% ($p < 0,01$) та спостерігалось відновлення його вмісту до показників контрольної групи тварин (рис. 3.28).

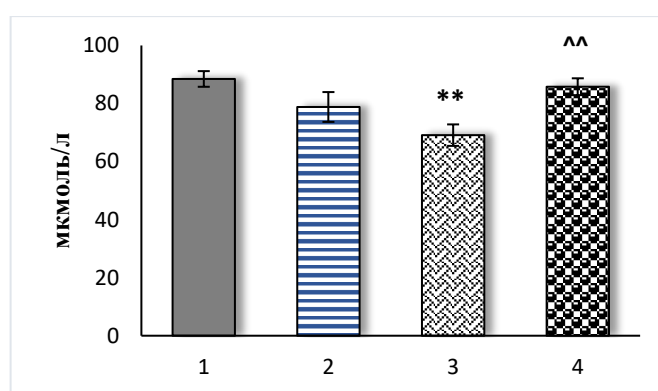


Рис. 3.28. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу НПЗП на тлі АІС ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – АІС, 3– Напроксен+АІС, 4 – АТВ-346+АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; ^^ – $p < 0,01$ порівняно з показниками при поєднаній дії АІС та напроксену

Отже, розвиток НПЗП-індукованих ентеропатій включає як простагландин-залежні, так і простагландин-незалежні механізми і зниження вмісту H_2S , що може відігравати важливу роль в патогенезі гастроінтестинальних уражень. В результаті наших досліджень доведено збільшення концентрації H_2S за умов введення АТВ-346 на тлі стресу в плазмі крові, що викликає менш виражений цитотоксичний вплив напроксену на СОТнК.

Порівнюючи зміни концентрації ТБК-активних продуктів та активність ензимів антиоксидантного захисту в гомогенатах СОТнК за умов поєданого інгібування ЦОГ та стресу було відзначено, що дія АТВ-346 на тлі АІС достовірно

підвищувала активність СОД на 17 % ($p < 0,05$) в СОТнК, також відмічений напрям до зниження концентрації ТБК-активних продуктів порівняно з показниками стресу. Отже, введення АТВ-346 на відміну від дії напроксену на тлі АІС призводить до збільшення активності СОД у гомогенатах СОТнК та зростання рівня H_2S у плазмі крові.

Таблиця 3.13

Активність ензимів антиоксидантного захисту та концентрація ТБК-активних продуктів за умов поєднаної дії НПЗП на АІС у СОТнК ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	ТБК-активні продукти (мкмоль/г)	СОД (МО/мг)	Каталаза (мкмоль/хв×мг)
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6
АІС	237,0±10,4**	22,2±0,9	20,3±1,3**
АІС + Напроксен	219,9±5,8	24,7±3,0	19,5±2,7
АІС+АТВ-346	222,6±7,7	26,0±1,6 [#]	22,2±1,5

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: ** – $p < 0,01$; відносно показників АІС: # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$.

За умов поєднаного впливу неселективного інгібітора ЦОГ напроксену на тлі дії АІС активність МПО збільшилась у гомогенатах СОТнК у 2,8 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з показниками контрольної групи тварин та відзначалась тенденція до зниження у порівнянні з самостійною дією АІС; за умов дії H_2S -вмісного НПЗП активність зменшилась у 1,7 рази ($p < 0,01$) порівняно з показниками самостійної дії АІС та в 1,6 рази порівняно з показниками напроксену на тлі стресу (рис. 3.29).

Висока активність МПО за умов дії напроксену на тлі стресу свідчить про нейтрофільну інфільтрацію СОТнК та активацію вільнорадикальних процесів, що

відіграє важливу роль у процесах ураження СОТнК. Зниження активності МПО за умов дії АТВ-346 на тлі АІС знаходять підтвердження попередніх результатів (підрозділ 3.2.1), що збільшення концентрації H_2S відіграє ключову роль у зниженні активності МПО, так як інгібує адгезію нейтрофілів до ендотелію судин.

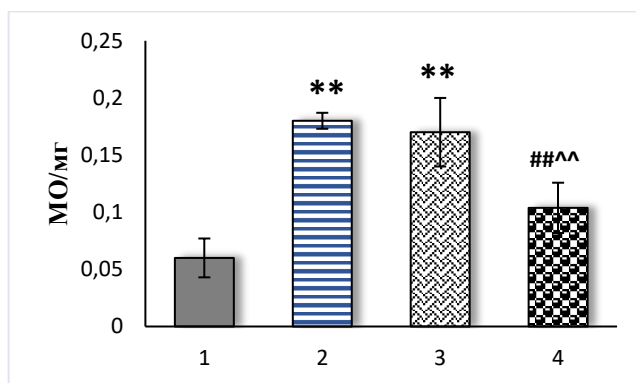


Рис. 3.29. Активність МПО в СОТнК за умов поєднаної дії НПЗП та АІС ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – АІС, 3– Напроксен+АІС, 4 – АТВ-346+АІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками АІС, ^^ – $p < 0,01$ порівняно з показниками при поєднаній дії АІС та напроксену

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 на тлі дії АІС призводить до розвитку морфологічних змін СОТнК, що проявлялись набряком, збільшенням висоти ворсинок, тоді як введення H_2S -вмісного НПЗП сприяв зниженню прозапальних процесів викликаних напроксеном та ВІС.

2. Введення напроксену за умов АІС викликало зниження активності іNOS, сNOS, аргінази, концентрації ТБК-активних продуктів і вмісту нітритів та нітратів в СОТнК та зменшення вмісту H_2S в плазмі крові порівняно з показниками стресу.

3. Одноразове введення АТВ-346 на тлі АІС супроводжувалось зниженням активності прозапальних ензимів (іNOS, МПО) та підвищенням активності сNOS, аргінази в СОТнК та вмісту H_2S , L-аргініну в плазмі крові порівняно з показниками поєднаної дії напроксену та стресу, що обумовлене зростанням вмісту H_2S .

Результати даного підрозділу опубліковані у наукових працях: [10, 20, 32].

3.3. Дія похідних 4-тіазолідинону в механізмах цитопротекції СОТнК за умов стресу та НПЗП-індукованих уражень

3.3.1. Оцінка морфологічних змін, визначення ролі систем NO-синтзи/аргінази, процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту в СОТнК та зміни вмісту H_2S у плазмі крові за умов поєднаного впливу ВІС та похідних 4-тіазолідинону. На сьогоднішній день інтенсивно досліджуються похідні 4-тіазолідинону, які взаємодіючи з різними молекулами, володіють вираженою противірусною, протимікробною, протипаразитарною, антиоксидантною та протизапальною активністю, а також беруть участь у процесах регуляції пухлинного росту. Серед похідних 4-тіазолідинону було виділено ряд «сполук-лідерів»: інгібітори UDP-MurNAc/L-Ala лігази, подвійні інгібітори ЦОГ-2/5-ЛОГ та сполуки, які проявляють афінитет до сімейства PPAR-рецепторів. Зважаючи на структурну спорідненість 4-тіазолідинонів до НПЗП, які містять тіонові групи як джерела сірководню, ряд експериментальних досліджень дозволяє також стверджувати їхню здатність бути донорами виділення H_2S за умов *in vitro* та *in vivo* [11, 41, 137].

Результатами наших досліджень, показано, що введення інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелона на тлі стресу не викликало деструктивних ушкоджень кишки та пригнічувало розвиток нітрузо-оксидативних процесів у СОТнК тварин (підрозділ 3.1.3). Тому в наших дослідженнях було використано похідні 4-тіазолідинону (сполуки Les-5054 та Les-5055) хімічно модифіковані сірковмісні похідні дарбуфелону, як потенційні донори H_2S .

Гістологічними дослідженнями показано, що за умов введення сполуки Les-5055 відзначалось збільшення кількості келихоподібних клітин, що супроводжувалось гіперсекрецією слизу. Ворсинки з ознаками набряку, приблизно однакової висоти порівняно з контролем. У стромі ворсинок присутня велика кількість клітинних елементів, серед яких переважають фібробласти. В окремих ворсинках відзначалась проліферація лейкоцитами. Крипти неглибокі і для деяких

з них характерна інтенсивна проліферація епітеліоцитів. У власній пластинці присутні судини заповнені форменими елементами крові (рис 3.30 – 2).

За умов застосування сполуки Les-5054 було зареєстровано помірне збільшення кількості келихоподібних клітин, а також незначну гіперсекрецію слизу. Основна речовина сполучної тканини слизової оболонки та підслизового прошарку була помірно інфільтрована лейкоцитами. В окремих ділянках спостерігали помірно виражений набряк сполучної тканини слизової оболонки та підслизового прошарку. Крипти глибокі, містили слизисту масу (рис. 3.30 – 3).

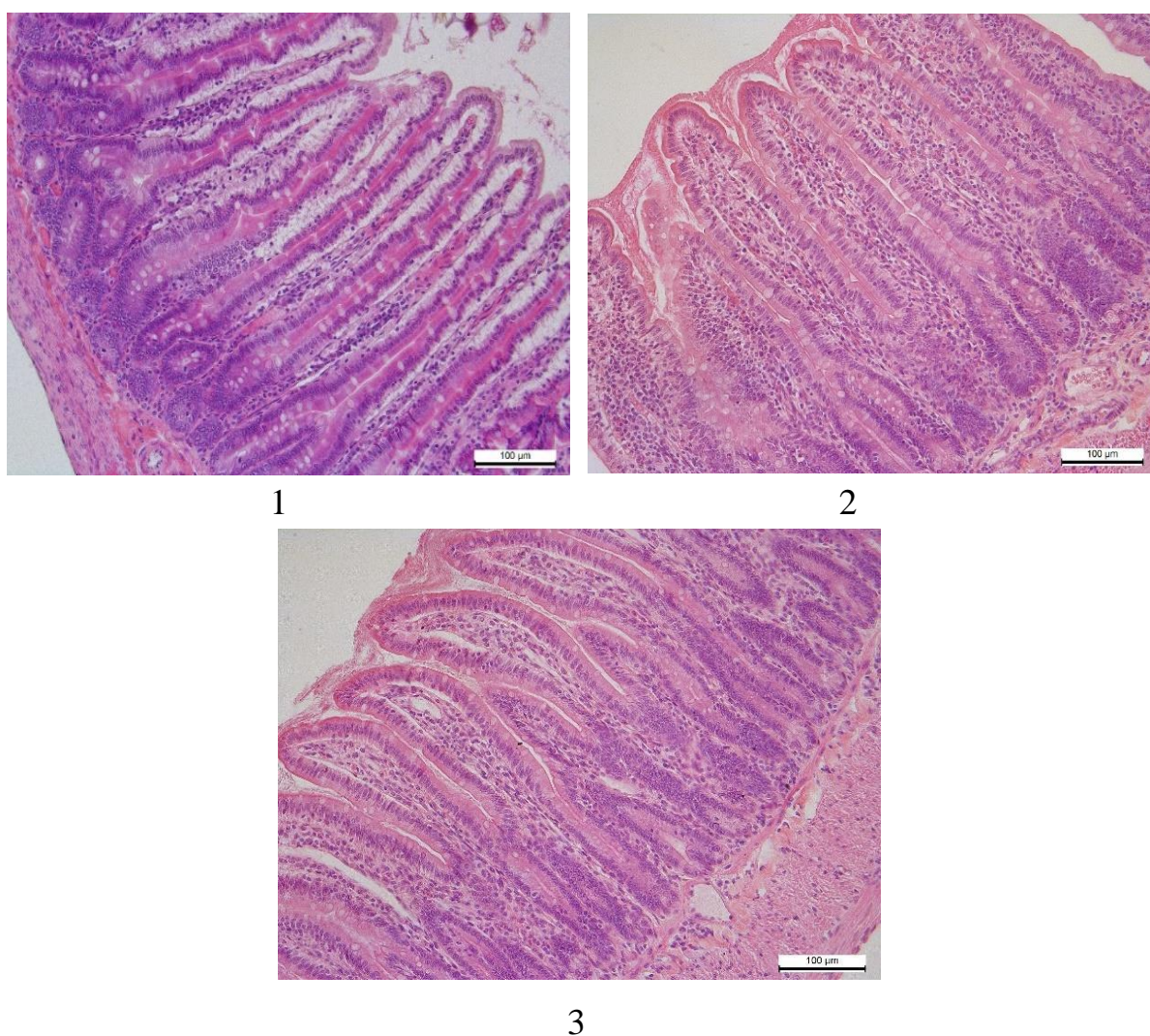


Рис. 3.30 Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов дії похідних 4-тіазолідинону; Гематоксилін та еозин x 200. 1 – Контроль, 2 – сполука Les-5055, 3 – сполука Les-5054

В результаті проведеного морфометричного аналізу гістологічних зрізів тонкої кишки зміни висоти ворсинок у порожньому відділі кишки за умов введення похідних 4-тіазолідинону не виявлено порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.31 – А). При цьому було зафіксовано збільшення ширини ворсинок за умов дії сполуки Les-5055 з $34,3 \pm 2,0$ до $40,5 \pm 0,9$ мкм ($p < 0,01$) та до $37,3 \pm 0,5$ мкм ($p < 0,05$) за умов введення сполуки Les-5054, порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.31 – В).

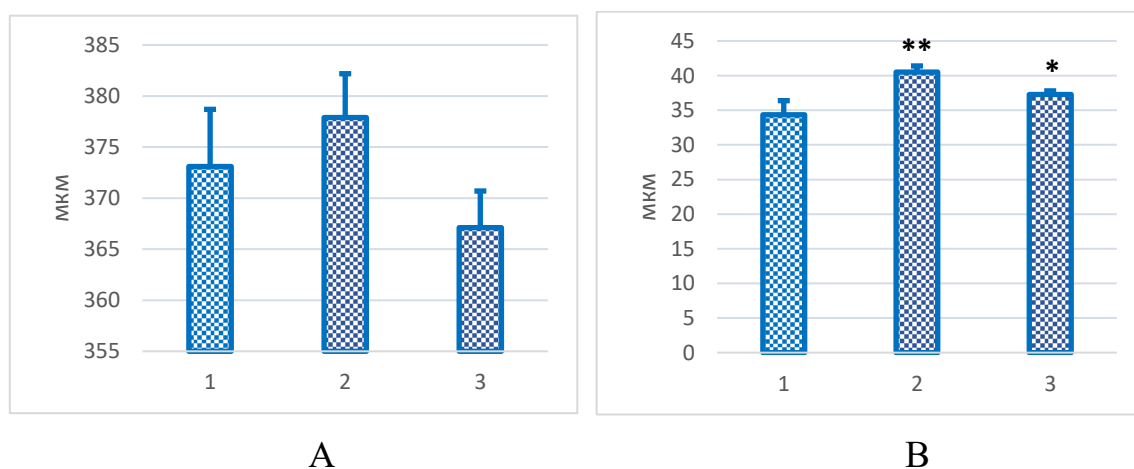


Рис. 3.31. Морфометричні показники СОТнК за умов дії похідних 4-тіазолідинону, ($M \pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок; 1 – контроль, 2 – сполука Les-5055, 3 – сполука Les-5054; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

В результаті морфогістологічних досліджень встановлено, що на відміну від НПЗП, дію яких було описано вище (підрозділ 3.1), введення похідних 4-тіазолідинону не викликало порушень цілісності слизового бар'єру, що може свідчити про знижений цитотоксичний вплив досліджуваних сполук на СОТнК.

Зміни нітрузо-оксидативних процесів за умов одноразового введення сполуки Les-5055 характеризується наступним: підвищилась активність iNOS у 1,5 рази ($p > 0,05$), при цьому відзначалося зниження активності cNOS на 12 % ($p < 0,05$) та аргінази на 30 % ($p < 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. За умов введення сполуки Les-5054 достовірних змін активності cNOS та аргінази

не було відзначено та активність iNOS мала напрям до зростання ($p > 0,05$) в СОТнК. Вміст L-аргініну в плазмі крові достовірно не змінювалась за умов самотійної дії похідних 4-тіазолідинону (табл 3.14).

Таблиця 3.14

Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та рівень L-аргініну в плазмі крові ($M \pm m$), $n=8$

Група тварин	Активність iNOS (нмоль/хв×мг)	Активність cNOS (нмоль/хв×мг)	Аргіназа мкмоль/хв×мг	L-аргінін мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
Les-5055	99,9±13,8	646,4±10,8*	0,14±0,01*	42,9±3,8
Les-5054	85,8±15,4	700,2±53,0	0,18±0,02	45,6±2,4

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$.

Застосування похідних 4-тіазолідинону призводило до зростання вмісту NO_2^- на 41 % ($p < 0,01$) за умов самотійної дії сполуки Les-5055 та на 16 % ($p < 0,05$) при дії сполуки Les-5054, порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.32 – А). За умов дії сполуки Les-5054 та Les-5055 відзначався напрям до збільшення концентрації суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в СОТнК ($p > 0,05$) (рис. 3.32 – В).

Результатами наших досліджень встановлено, що введення сполуки Les-5054 виражено не впливало на активність iNOS. Дія сполуки Les-5055 викликала напрям до зростання активності iNOS та достовірно збільшувала вміст стабільних метаболітів NO, при цьому відзначено зниження ($p > 0,05$) активності cNOS та аргінази у СОТнК.

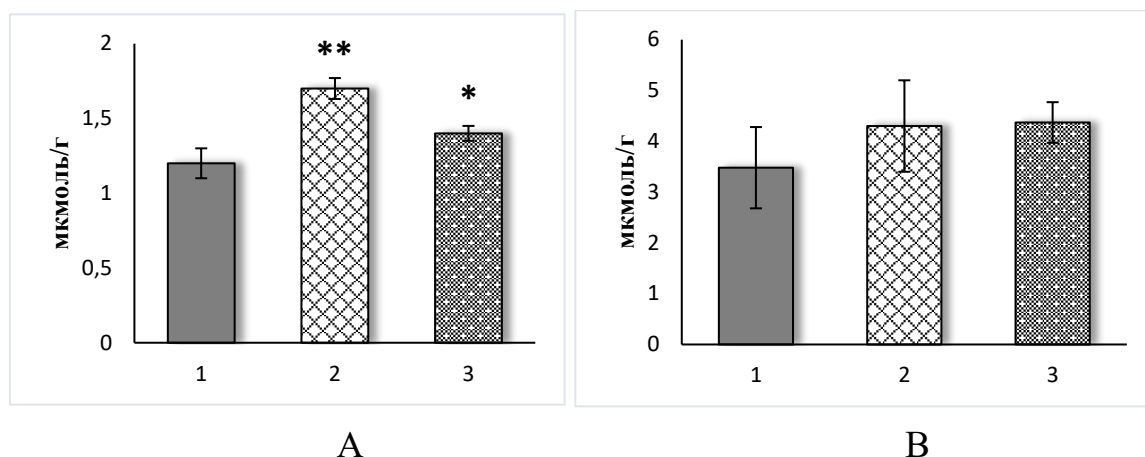


Рис. 3.32 Концентрація NO_2^- (А) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – контроль, 2 – сполука Les-5055, 3 – сполука Les-5054; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

За умов дії сполуки Les-5055 знижувався рівень H_2S в плазмі крові з $88,4 \pm 2,7$ мкмоль/л до $79,7 \pm 2,0$ мкмоль/л ($p < 0,01$); тоді як введення сполуки Les-5054 не змінювало рівня цього газотрансмітера порівняно з даними контрольних тварин (рис. 3.33).

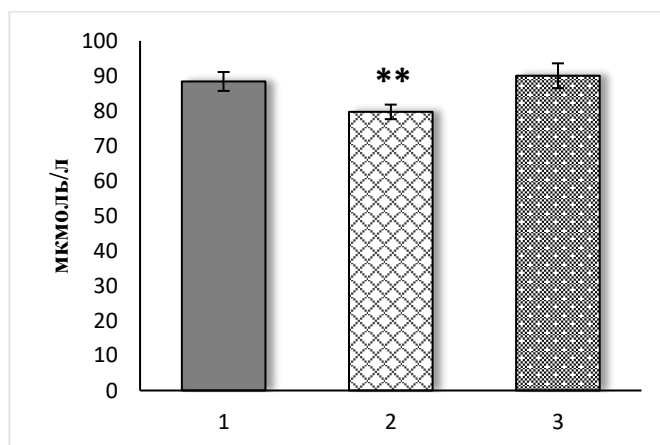


Рис. 3.33. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу похідних 4-тіазолідинону ($M \pm m$, $n=8$); 1 – контроль, 2 – Les-5055, 3 – Les-5054; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи

За умов самостійної дії похідних 4-тіазолідинону вміст ТБК-активних продуктів у СОТнК не змінювався у порівнянні з показниками контролю і свідчить

про те, що введення досліджуваних препаратів запобігає розвитку процесів ліпопероксидації.

Блокування ЦОГ/ЛОГ шляхом введення похідних 4-тіазолідинону супроводжується підвищенням активності ензимів антиоксидантного захисту. Введення сполуки Les-5054 викликало більш виражені зміни, а саме активність СОД збільшувалась на 17 % ($p < 0,05$), а каталази – на 19 % ($p < 0,05$) у гомогенатах СОТнК порівняно з показниками контролю (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Активність ензимів антиоксидантного захисту, МПО та концентрація ТБК-активних продуктів за умов дії похідних 4-тіазолідинону у СОТнК ($M \pm m$, $n=8$)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг	МПО, МО/мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6	0,06±0,01
Les-5055	191,8±7,5	26,5±2,9	19,6±1,2	0,06±0,01
Les-5054	185,7±6,5	28,0±1,2**	20,2±0,5*	0,04±0,009

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Отже, дія похідних 4-тіазолідинону змінювала співвідношення про-антиоксидантної системи у сторону підвищення антиоксидантної системи, що може відігравати ключову роль у підвищенні цитопротекторних механізмів СОТнК.

В результаті введення сполуки Les-5055 та Les-5054 не спостерігалось змін активності МПО (табл. 3.15). На відміну від дії НПЗП, які підвищували активність МПО, введення похідних 4-тіазолідинону не викликало змін активності МПО.

Проведені нами дослідження впливу похідних 4-тіазолідинону дозволили зробити наступні висновки:

1. Введення похідних 4-тіазолідинону як сполуки Les-5055, так і сполуки Les-5054 не викликало видимих макроскопічних змін СОТнК. При аналізі гістологічних зрізів тонкої кишки відзначається гіперсекреція слизу та розвиток набряку сполучної тканини слизової оболонки та підслизового прошарку, що підтверджується збільшенням ширини ворсинок при морфометричному аналізі.

2. Введення сполуки Les-5055 призводило до підвищення активності iNOS, ензимів антиоксидантного захисту та рівня нітритів і нітратів в СОТнК, паралельно фіксувалось зниження активності cNOS, аргінази в СОТнК та концентрації H_2S в плазмі крові.

3. При самостійній дії сполуки Les-5054 відзначається підвищення рівня H_2S в плазмі крові та активності ензимів антиоксидантної системи (СОД, каталази) в СОТнК. Параметри системи NO-синтаза/аргіназа, концентрація ТБК-активних продуктів були на рівні показників контрольної групи.

3.3.2. Морфологічний стан, NO-синтазна/аргіназна система, процеси ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК за умов поєднаної дії похідних 4-тіазолідинону та стресу. Для оцінки протизапальної дії похідних 4-тіазолідинону, нами було досліджено їх вплив на морфологічні та біохімічні зміни СОТнК за умов їх поєднаної дії на тлі стресу.

Гістологічно за умов введення сполуки Les-5055 на тлі ВІС відзначалась дезорганізація та інфільтрація лімфоцитами строми ворсинок. Реєстрували помірне збільшення кількості келихоподібних клітин, а також незначну гіперсекрецію слизу. Ворсинки високі, з ознаками набряку. Крипти глибокі, заповненні продуктами секреторної діяльності (рис. 3.34 – 3).

За умов введення сполуки Les-5054 на тлі ВІС відзначали ворсинки різної висоти, на поверхні яких візуалізувалась надмірна кількість слизистого секрету, що містив десквамовані келихоподібні клітини; в окремих ділянках спостерігали помірно виражений набряк сполучної тканини слизової оболонки та підслизового

прошарку, серед епітеліоцитів ворсинок була присутня велика кількість келихоподібних клітин. Крипти були дещо розширені та містили слизисту масу (рис. 3.34 – 4).

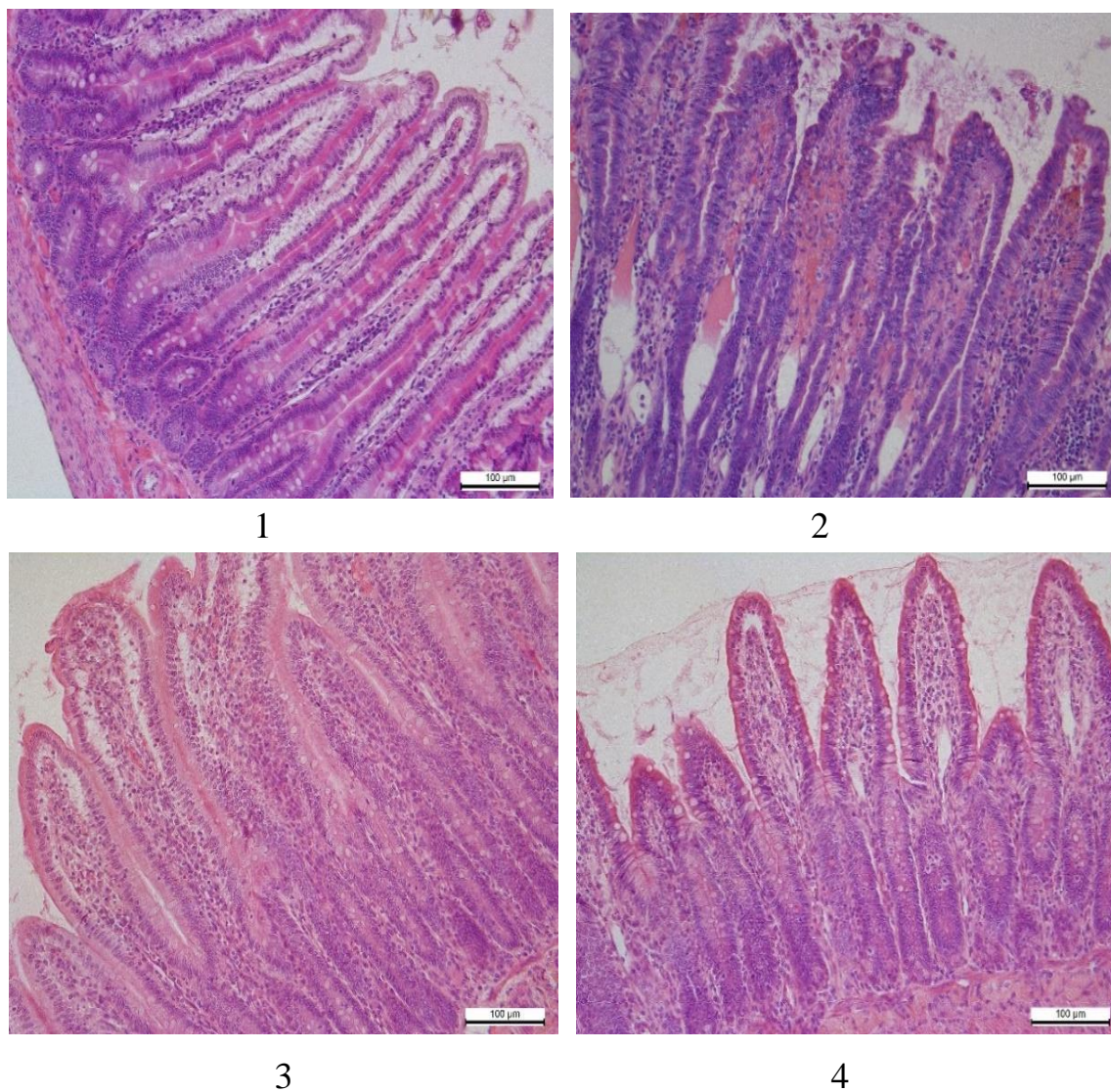


Рис. 3.34. Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу; Гематоксилін та еозин x 200. 1 – Контроль, 2 – BIC, 3 – Les-5055 за умов BIC, 4 – Les-5054 на тлі BIC

Висота ворсинок порожнього відділу за умов дії сполуки Les-5055 на тлі BIC збільшилась на 36,2 мкм ($P < 0,01$), порівняно із показниками контрольної групи та не відрізнялись від показників стресу. Тоді як введення сполуки Les-5054 на тлі стрес-індукованих змін викликало протилежний вплив та спостерігалось

зменшення висоти ворсинок на 14 % ($p < 0,01$), порівняно із самостійною дією ВІС (рис. 3.35 – А). Також було встановлено, що поєднана дія стресу та Les-5055 призводила до збільшення ширини ворсинок у порожній кишці з $34,3 \pm 2,0$ мкм до $41,5 \pm 1,1$ мкм ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи тварин та не було відзначено достовірних змін порівняно із показниками самостійного ВІС. Введення сполуки Les-5054 на тлі ВІС призводило до зменшення ширини ворсинок з $40,9 \pm 0,4$ мкм до $37,15 \pm 2,8$ мкм ($p < 0,05$), порівняно з показниками стресу (рис. 3.35 – В).

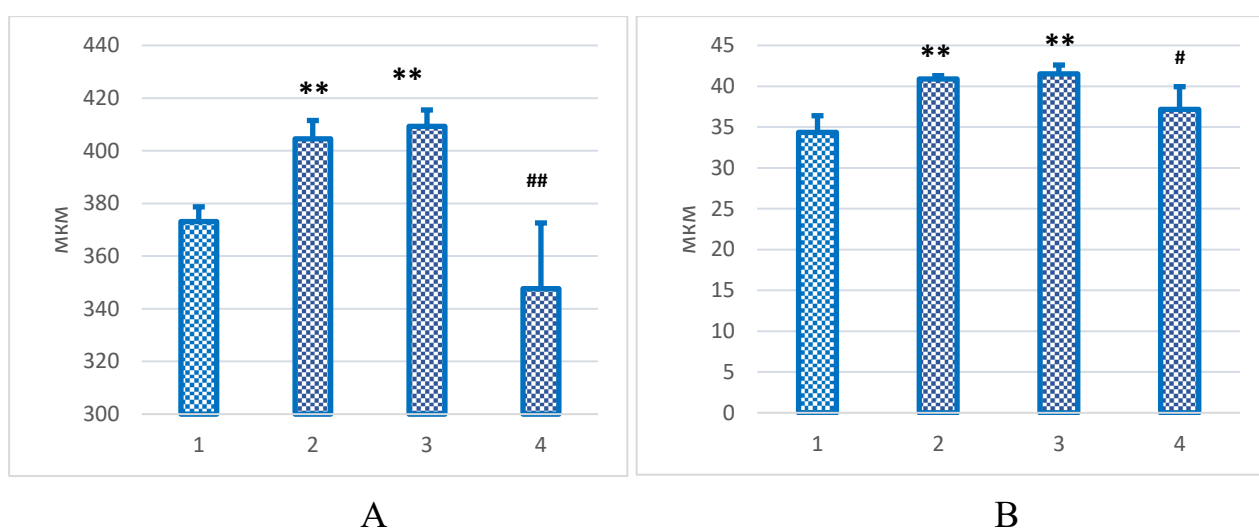


Рис. 3.35. Морфометричні показники СОТнК за умов поєднаної дії ВІС та похідних 4-тіазолідину, ($M \pm m$, $n=8$); А – висота ворсинок, В – ширина ворсинок; 1 – контроль, 2 – дія ВІС, 3 – Les-5055 на тлі ВІС, 4 – Les-5054 на тлі ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи, ## – $p < 0,01$, # – $p < 0,05$ порівняно з показниками ВІС

Отже, введення похідних 4-тіазолідину за умов стрес-індукованих змін призводило до різносторонніх змін СОТнК, про що свідчить морфометричний аналіз гістологічних зрізів слизової оболонки порожнього відділу кишки. Введення сполуки Les-5055 на тлі ВІС не викликало достовірних змін порівняно з показниками самостійного ВІС, а при дії сполуки Les-5054 за умов стресу спостерігається зменшення висоти ($p < 0,01$) та ширини ($p < 0,05$) ворсинок

порівняно з показниками стресу та наближення цих значень до показників контрольної групи тварин.

Введення сполуки Les-5055 за умов стресу підвищувало активність cNOS на 42 % ($p<0,01$) у СОТнК та вмісту L-аргініну в 2,5 рази ($p<0,01$) в плазмі крові, порівняно з показниками самостійної дії ВІС. Також відзначена тенденція до зниження активності iNOS та підвищення активності аргінази в СОТнК ($p>0,05$), порівняно з показниками стресу. За умов використання сполуки Les-5054 на тлі ВІС відзначені більш виражені зміни NOS/аргіназної системи, а саме активність cNOS та аргінази підвищувалась на 48 % ($p<0,01$) та в два рази ($p<0,01$), відповідно, при цьому активність iNOS знижувалась на 21 % ($p<0,01$) у СОТнК, порівняно з самостійною дією ВІС; вміст L-аргініну в плазмі крові зростав в 2,5 рази ($p<0,01$) (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та рівень L-аргініну в плазмі крові за умов стресу ($M\pm m$), $n=8$

Група тварин	Активність iNOS (нмоль/хв×мг)	Активність cNOS (нмоль/хв×мг)	Аргіназа мкмоль/хв×мг	L-аргінін мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
ВІС	188,9±9,8**	312,5±32,3**	0,07±0,01**	17,2±1,9**
ВІС + Les-5055	153,5±32,0	445,3±24,8##	0,09±0,01	43,2±1,4##
ВІС+Les-5054	148,9±6,7##	462,6±30,4##	0,14±0,005##	43,9±6,9##

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: ** – $p<0,01$; відносно показників ВІС: ## – $p<0,01$;

Використання похідних 4-тіазолідинону, а саме сполуки Les-5054, на тлі стресу сприяє пригніченню активності iNOS та паралельно відзначено підвищення активності аргінази, що свідчить про відновлення неокисного шляху метаболізму L-аргініну до орнітину та сечовини, а також синтезу поліамінів, які відіграють важливу роль в антиоксидантній системі.

При введенні похідних 4-тіазолідинону на тлі стресу достовірно знижувався вміст NO_2^- в СОТнК, а саме на 23 % ($p > 0,05$) при дії сполуки Les-5055 та на 27 % ($p < 0,05$) за умов впливу Les-5054 (рис. 3.36 – А). При цьому, за умов поєднаної дії ВІС та сполуки Les-5054 вміст $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ знижується на 30 % ($p < 0,05$) та на 38 % ($p < 0,05$) за умов введення сполуки Les-5054 на тлі стресу (рис. 3.36 – В).

Відповідно до пригнічення активності iNOS відзначалось зниження вмісту метаболітів NO у гомогенатах СОТнК тварин за умов введення похідних 4-тіазолідинону на тлі стресу, що свідчить про їх пригнічувальний вплив на окисний шлях метаболізму L-аргініну та як результат зниження інтенсивності нітрато-оксидативних процесів в тонкій кишці.

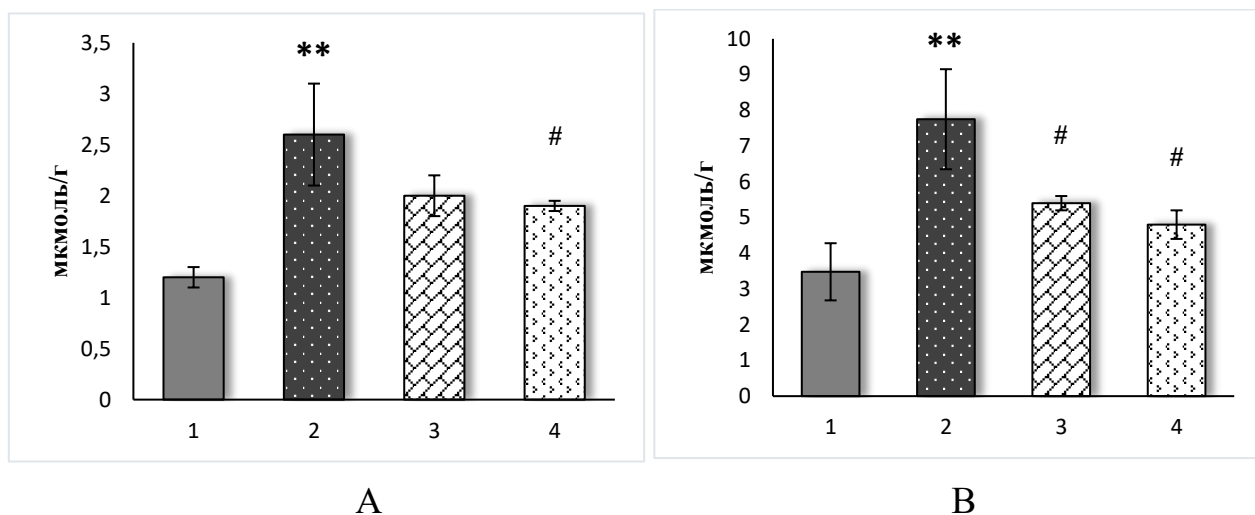


Рис. 3.36. Концентрація NO_2^- (А) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – контроль, 2 – дія ВІС протягом 5 год, 3 – Les-5055 на тлі ВІС, 4 – Les-5054 на тлі ВІС; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками ВІС

Як показано на рис. 3.37 – введення досліджуваних сполук призводило до зростання рівня H_2S в плазмі крові за умов стресу. Дія сполуки Les-5055 на тлі ВІС підвищувала рівень H_2S на 36 % ($p<0,01$) та на 54 % ($p<0,01$) при дії Les-5054. При цьому слід зазначити, що в плазмі крові рівень H_2S за умов введення сполуки Les-5054 на тлі ВІС навіть перевищував показники контрольної групи тварин, що свідчить про інтенсивне його вивільнення з молекули Les-5054.

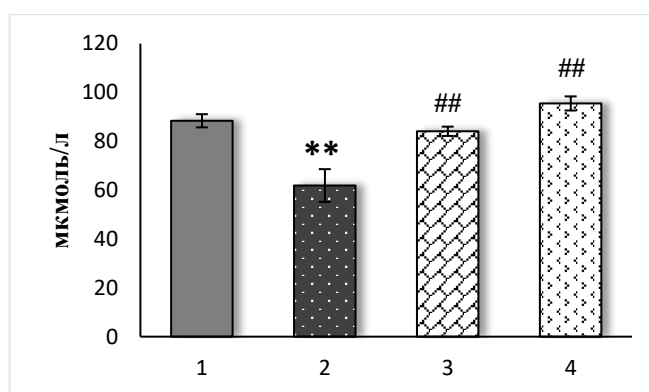


Рис. 3.37. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу похідних 4-тіазолідинону на тлі ВІС ($M\pm m$, $n=8$); 1 – контроль, 2 – дія ВІС, 3 – Les-5055 на тлі ВІС, 4 – Les-5054 на тлі ВІС; ** – $p<0,01$ порівняно з показниками контрольної групи; ## – $p<0,01$ порівняно з показниками ВІС

В результаті проведених досліджень встановлено, що застосування сполуки Les-5054 на тлі ВІС викликало зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 22 % ($p<0,05$), тоді як за умов введення сполуки Les-5055 проявлялась тенденція до зниження, порівняно з показниками самостійної дії ВІС. За умов дії похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-5054 та Les-5055) на тлі ВІС відзначений обернений кореляційний зв'язок між змінами ТБК-активних продуктів та концентрацією H_2S ($r=-0,437$; $p<0,05$).

Введення похідних 4-тіазолідинону знижує пригнічувальний вплив стресу на активність ензимів АОЗ та відзначено зростання активності СОД на 29 % ($p<0,05$) за умов поєднаної дії стресу та сполуки Les-5055 та на 48 % ($p<0,01$) при дії сполуки

Les-5054 на тлі стресу, порівняно з показниками ВІС; також визначена тенденція до підвищення активності каталази ($p > 0,05$) за умов похідних 4-тіазолідинону на тлі стресу (табл. 3.17).

Таким чином, застосування похідних 4-тіазолідинону, як потенційних донорів H_2S , на тлі ВІС призводило до зменшення процесів перекисного окиснення ліпідів, про що свідчить зменшення концентрації ТБК-активних продуктів в гомогенатах СОНК тварин. Також відзначалось зростання активності СОД. Активність МПО за умов введення сполуки Les-5055 на тлі ВІС знижувалась на 30 % ($p < 0,05$) та в 2,5 рази ($p < 0,01$) за умов поєднаної дії сполуки Les-5054 та ВІС, порівняно з показниками стресу (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

Активність ензимів антиоксидантного захисту, МПО та концентрація ТБК-активних продуктів за умов поєднаної дії похідних 4-тіазолідинону та ВІС у СОНК ($M \pm m, n=8$)

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв×мг	МПО, МО/мг
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6	0,06±0,01
ВІС 5 год	261,0±16,0**	20,2±1,8*	15,7±2,9	0,3±0,03**
ВІС + Les-5055	239,6±7,8	26,1±2,7 [#]	17,5±2,3	0,21±0,05 [#]
ВІС+Les-5054	208,5±19,9 [#]	30,0±0,8 ^{##}	17,9±1,6	0,12±0,01 ^{##}

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; відносно показників ВІС: [#] – $p < 0,05$, ^{##} – $p < 0,01$.

Згідно літературних джерел, H_2S може реагувати з АФК і АФН, в тому числі супероксид-аніон радикалом, перекисом водню, пероксинітрином і гіпохлоритом, що підтверджує антиоксидантні властивості газового медіатора [16, 80, 106, 255]. Відновлення його вмісту за умов застосування похідних 4-тіазолідинону сприяє відновленню показників про-антиоксидантної рівноваги в СОТнК.

Отже, введення похідних 4-тіазолідинону на тлі стресу викликало зміни активності NO-синтази, аргінази, вмісту газових медіаторів та процесів ліпопероксидації, що пов'язано із зростанням рівня H_2S та обґрунтовує їх цитопротекторну дію.

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. Застосування похідних 4-тіазолідинону не викликало макроскопічних морфологічних змін у СОТнК, проте відзначались зміни висоти ворсинок за умов дії обох сполук.

2. Введення сполуки Les-5055 на тлі ВІС призводило до достовірного підвищення активності cNOS, СОД в СОТнК та вмісту L-аргініна та H_2S в плазмі крові, вміст ТБК-активних продуктів, нітритів та нітратів знижувався порівняно з показниками ВІС.

3. Поєднана дія сполуки Les-5054 та стресу викликала більш виражені зміни, що супроводжувалось зниженням активності прозапальних ензимів (iNOS, МПО) та підвищенням активності cNOS, аргінази, СОД в СОТнК, та вмісту L-аргініну, H_2S в плазмі крові; паралельно відзначалось зниження процесів ліпопероксидації.

3.3.3. Дослідження активності NO-синтази, процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту за умов дії похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень. Тривале застосування НПЗП прийнято вважати основною причиною розвитку гастроінтестинальних уражень [14, 180, 181]. Незважаючи на це, ще не повністю зрозумілий механізм впливу НПЗП на СОТнК та не вивчена дія похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП.

Одноразове введення індометацину в дозі 35 мг/кг через 72 год супроводжувалось розвитком структурно-геморагічних ушкоджень в тонкій кишці

тварин, що локалізувались в дистальному відділі кишки (рис. 3.38 – 2). Слід відзначити, деструктивних ушкоджень слизової оболонки шлунка за цих умов не було виявлено. Як було описано вище (підрозділ 3.1), введення індометацину (у дозі 10 мг/кг) також призводило до порушення цілісності слизового бар'єру в порожньому відділі тонкої кишки, що фіксується на гістологічних зрізах. Отримані дані підтверджують та поглиблюють раніше отримані результати морфологічних змін СОТнК, що мають місце при дії неселективних НПЗП.

Триразове введення похідних 4-тіазолідинону (доза 10 мг/кг) на тлі індометацин-індукованих уражень призводило до зменшення розвитку деструктивних змін СОТнК тварин (рис. 3.38 – 3,4).

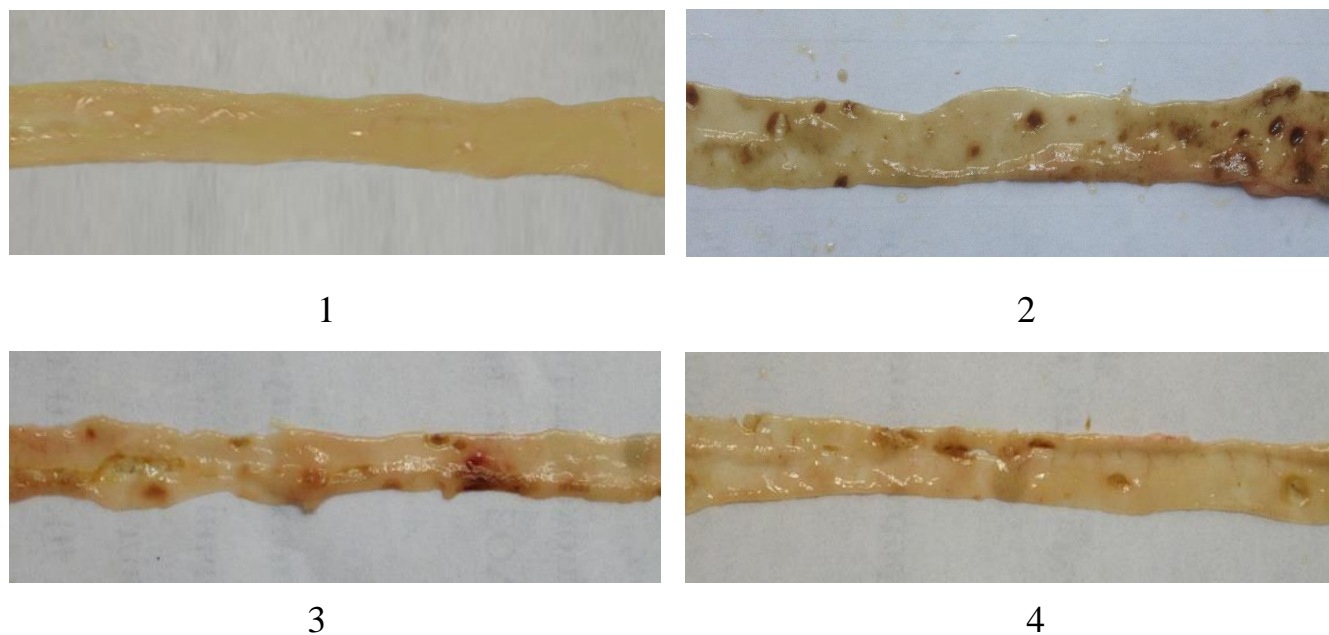


Рис. 3.38. Макроскопічний стан СОТнК за умов впливу похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень; 1 – контроль, 2 – індометацин-індуковані ураження; 3 – Les-5055 на тлі НПЗП-індукованих уражень, 4 – Les-5054 на тлі НПЗП-індукованих уражень

Середня площа уражень за умов тривалої дії індометацину складала $74,0 \pm 5,9 \text{ мм}^2$, тоді як введення досліджуваних сполук зменшує ентеротоксичний вплив НПЗП, що підтверджується зменшенням площі уражень. За умов дії сполуки

Les-5055 на тлі індометацину відзначається зниження площі деструктивних ушкоджень на 37 % ($p < 0,05$), порівняно із самостійною дією індометацину. Тоді як введення сполуки Les-5054 за умов НПЗП-індукованих уражень сприяло зменшенню площі ушкоджень до $26,8 \pm 3,0 \text{ мм}^2$ ($p < 0,05$) (рис. 3.39).

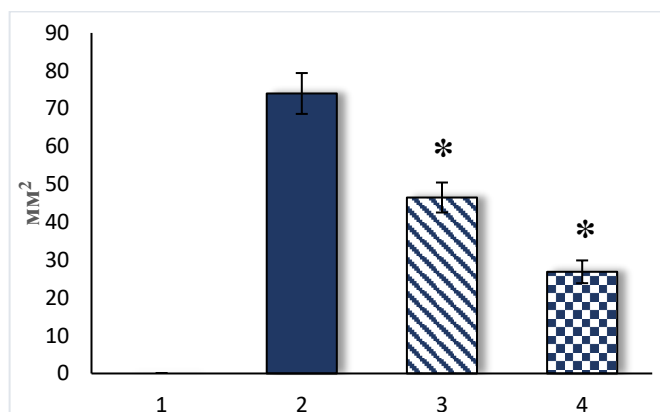


Рис. 3.39. Площа структурно-геморагічних ушкоджень СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – Індометацин-індуковані ураження; 3 – Les-5055 на тлі дії індометацину, 4 – Les-5054 на тлі дії індометацину; * – $p < 0,05$ порівняно з показниками самостійної дії індометацину

Отже, введення похідних 4-тіазолідинону за умов НПЗП-індукованих уражень проявляло виражений цитопротекторний вплив, що може бути пов'язаним із зменшенням продукції лейкотрієнів в результаті пригнічення ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти, так із збільшенням вмісту H_2S .

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином супроводжувалось змінами параметрів NO-синтазної/аргіназної системи: активність iNOS зростала втричі ($p < 0,01$), активність sNOS знижувалась більш, ніж 2 рази ($p < 0,01$), активність аргінази знижувалась в 4 рази ($p < 0,01$) у СОТнК, вміст L-аргініну в плазмі крові за цих умов знижувався на 33 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи тварин (табл. 3.18).

За умов введення сполуки Les-5055 на тлі індометацину відзначено зниження активності iNOS на 20 % ($p < 0,05$) у СОТнК, порівняно з контрольною групою

тварин, тоді як активність сNOS підвищувалась на 25 % ($p < 0,05$). Також відзначалось підвищення активності аргінази у 1,8 рази ($p < 0,05$). При цьому було зафіксовано підвищення концентрації L-аргініну в плазмі крові на 30 % ($p < 0,05$) (табл. 3.18).

Вплив сполуки Les-5054 за умов дії індометацину на параметри NO-синтазної/аргіназної системи супроводжувалось більш вираженими змінами ніж при дії сполуки Les-5055: активність іNOS зменшилась на 35 % ($p < 0,01$), паралельно підвищувалась активність сNOS та аргінази на 52 % ($p < 0,01$) та в 3 рази ($p < 0,01$), відповідно; у плазмі крові зростає вміст L-аргініну на 36 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками самостійної дії індометацину.

Таблиця 3.18

Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та рівень L-аргініну в плазмі крові за умов НПЗП-індукованих уражень ($M \pm m$), $n=8$

Група тварин	Активність іNOS (нмоль/хв×мг)	Активність сNOS (нмоль/хв×мг)	Аргіназа мкмоль/хв×мг	L-аргінін мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6
Індометацин	203,6±26,8**	331,9±62,5**	0,05±0,02**	31,2±2,8**
Les-5055 + Індометацин	162,3±27,7	415,9±44,0	0,09±0,006 [#]	40,7±4,2 [#]
Les-5054 + Індометацин	132,9±27,5 [#]	506,3±45,3 ^{##}	0,15±0,04 ^{##}	42,6±4,1 [#]

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: ** – $p < 0,01$; відносно показників самостійної дії індометацину: [#] – $p < 0,05$, ^{##} – $p < 0,01$.

Відповідно до змін активності NOS відзначалось збільшення вмісту стабільних метаболітів NO у гомогенатах СОТнК тварин за умов НПЗП-

індукованих уражень. Самостійна дія індометацину викликала збільшення вмісту NO_2^- більш ніж у 2 рази ($p < 0,01$) та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у 1,9 рази ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. За умов введення сполуки Les-5055 відзначається зменшення вмісту NO_2^- на 32 % ($p < 0,01$) та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ на 24 % ($p > 0,05$), тоді як за умов введення сполуки Les-5054 їх вміст знижується на 35 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками самостійної дії індометацину (рис. 3.40).

Отже, зміни системи NO-синтаза/аргіназа за умов дії інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 упродовж 72 год свідчать про різке зростання iNOS внаслідок чого вміст L-аргініну в плазмі крові знижувався, продукція NO зростала. Введення похідних 4-тіазолідинону (переважно сполуки Les-5054) за умов дії індометацину викликало гальмування активності iNOS, внаслідок чого знижувався вміст метаболітів NO, збільшувалась активність cNOS, аргінази у СОТнК та концентрація L-аргініну в плазмі крові.

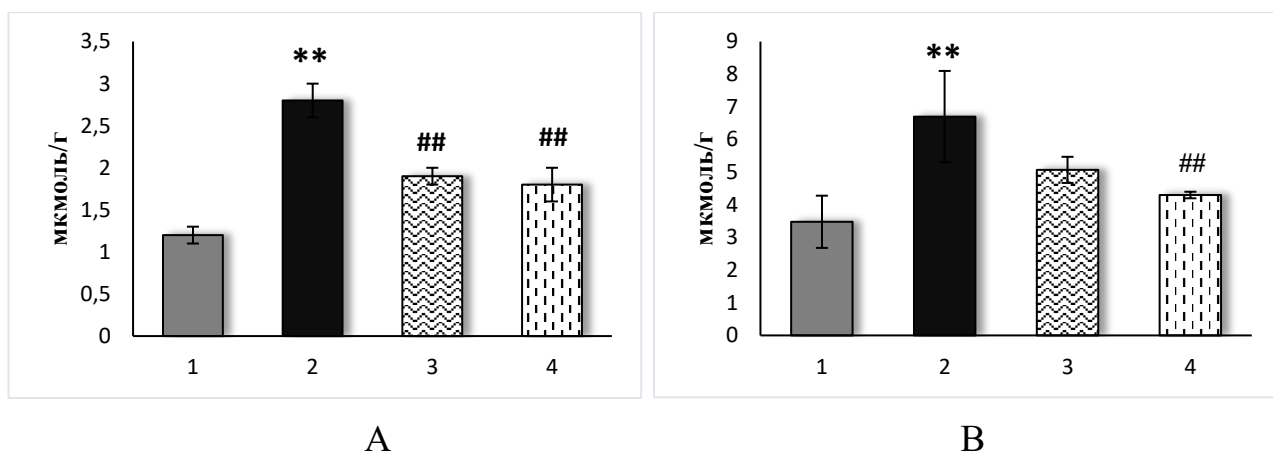


Рис. 3.40. Концентрація NO_2^- (А) та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ (В) в гомогенатах СОТнК ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – Індометацин-індуковані ураження; 3 – Les-5055 на тлі дії індометацину, 4 – Les-5054 на тлі дії індометацину; ** – $p < 0,01$ порівняно з показниками контрольної групи, ## – $p < 0,01$ порівняно з показниками самостійної дії індометацину

Блокування ЦОГ індометацином сприяло зниженню вмісту H_2S в плазмі крові на 10 % ($p < 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Введення сполуки Les-5055 на тлі дії індометацину підвищувало рівень H_2S на 17 % ($p < 0,05$), а при введенні сполуки Les-5054 за цих умов – на 24 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками самостійної дії індометацину (рис. 3.41). Застосування похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень, як потенційних донорів H_2S , викликало відновлення вмісту газового медіатора в плазмі крові, що перевищували показники контрольної групи тварин.

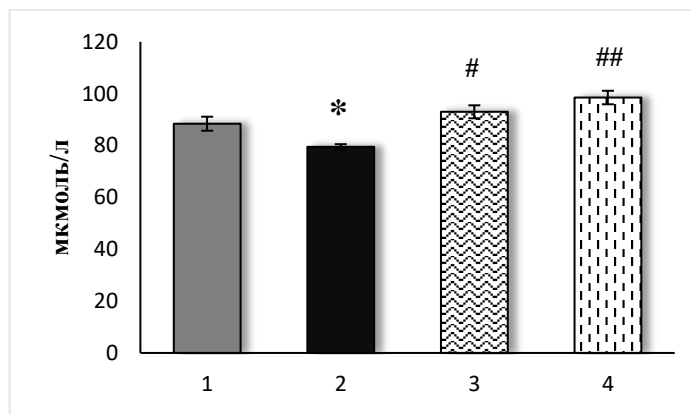


Рис. 3.41. Концентрація H_2S в плазмі крові за умов впливу похідних 4-тіазолідинону на тлі ВІС ($M \pm m$, $n=8$); 1 – Контроль, 2 – Індометацин-індуковані ураження; 3 – Les-5055 на тлі дії індометацину, 4 – Les-5054 на тлі дії індометацину; * – $p < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи, # – $p < 0,05$ порівняно з показниками самостійної дії індометацину

Дія блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 протягом 72 год призводила до збільшення інтенсивності процесів ліпопероксидації у СОТнК, про що свідчить збільшення концентрації ТБК-активних продуктів на 56 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. Відповідно до активації процесів ПОЛ відзначається компенсаторне збільшення активності ензимів антиоксидантного захисту – підвищувалась активність СОД на 16 % ($p < 0,05$) та каталази на 32,5 % ($p < 0,05$), порівняно з показниками контролю.

Введення похідних 4-тіазолідинону сприяє зменшенню концентрації ТБК-активних продуктів, при цьому зміни активності ензимів антиоксидантного захисту були недостовірні. Введення сполуки Les-5055 на тлі дії індометацину викликає

зниження концентрації ТБК-активних продуктів на 17 % ($p < 0,05$), тоді як дія сполуки Les-5054 – на 31 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками самостійної дії індометацину. Слід відзначити, що при введенні сполуки Les-5054 за умов неселективного блокування ЦОГ індометацином зафіксовано достовірне зниження активності СОД на 10 % ($p < 0,05$) у СОТнК порівняно з показниками самостійної дії індометацину (табл. 3.19).

Активність МПО у СОТнК зростала більш, ніж у 4 рази за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином, порівняно з показниками контрольної групи тварин, що свідчить про інфільтрацію поліморфноядерними лейкоцитами у зоні ушкодження кишки. За умов поєднаної дії сполуки Les-5054 та індометацину фіксується зниження активності МПО більш ніж у два рази ($p < 0,01$), порівняно з показниками самостійної дії індометацину.

Таблиця 3.19

Активність ензимів антиоксидантного захисту, МПО та концентрація ТБК-активних продуктів за умов дії похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень у СОТнК ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	ТБК-активні продукти (мкмоль/г)	СОД (МО/мг)	Каталаза (мкмоль/хв×мг)	МПО (МО/мг)
Контроль	186,6±8,1	23,9±1,0	16,9±1,6	0,06±0,01
Індометацин	291,4±26,7**	27,8±1,3*	22,4±2,6*	0,25±0,02**
Les-5055 + Індометацин	242,6±16,0 [#]	27,9±1,5	20,0±2,4	0,21±0,06
Les-5054 + Індометацин	199,1±11,1 ^{##}	24,9±0,9 [#]	20,9±1,2	0,08±0,02 ^{##}

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: ** – $p < 0,01$; відносно показників самостійної дії індометацину: [#] – $p < 0,05$, ^{##} – $p < 0,01$.

Проведені нами дослідження впливу похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень дозволили зробити наступні висновки:

1. Неселективне блокування ЦОГ індометацино протягом 72 год викликає розвиток структурно-геморагічних уражень в дистальному відділі тонкої кишки. Введення похідних 4-тіазолідинону (в основному сполуки Les-5054) за умов дії індометацину сприяє зниженню цитотоксичної дії НПЗП, про що свідчить зменшення площі деструктивних ушкоджень СОТнК.

2. Самостійна дія індометацину призводила до підвищення активності прозапальних ензимів (iNOS, МПО), інтенсифікації процесів ліпопероксидації та значного зростання продукції NO у СОТнК; при цьому було відмічено пригнічення активності cNOS, аргінази у СОТнК та вмісту L-аргініну і H₂S у плазмі крові.

3. Застосування сполуки Les-5055 за умов НПЗП-індукованих уражень сприяло зниженню активності iNOS, концентрації ТБК-активних продуктів, паралельно підвищувалась активність cNOS, аргінази у СОТнК та вміст L-аргініну і H₂S у плазмі крові.

4. Біохімічні зміни параметрів NO-синтазної/аргіназної системи, зниження перебігу вільнорадикальних процесів (зниження ТБК-активних продуктів) та лейкоцитарної інфільтрації зони ураження (зниження активності МПО) за умов поєднаної дії сполуки Les-5054 та індометацину свідчать про цитопротекторні властивості досліджуваної сполуки.

5. Отримані результати свідчать, що похідні 4-тіазолідинону можуть бути перспективними прекурсорами для створення нових протизапальних препаратів, механізм дії яких включає антиоксидантний вплив (за рахунок фенольного кільця) та вивільнення H₂S.

Результати даного підрозділу опубліковані у наукових працях: [18, 19, 21, 111–116].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ентеропатії відносять до найбільш складних для діагностування та лікування патологій органів травлення. Серед ключових чинників, що викликають деструктивно виразкові ушкодження слизових оболонок органів травної системи є стрес та дія НПЗП. Як вплив стресу, так і дія НПЗП призводять до виникнення морфологічних ушкоджень у першу чергу СОШ, а також їх ульцерогенний вплив на мікроскопічному рівні визначався у СОТнК та слизовій оболонці товстої кишки [2, 28].

У основі дії стресу лежить активація симпато-адреналової системи та зростання у крові, у першу чергу концентрації адреналіну, який за участю α -адренорецепторів гладких м'язів судин викликає вазоконстрикцію, що призводить до ішемії клітин та вивільнення лізосомальних ферментів та різкого зростання нітрузо-оксидативних процесів у слизових оболонках органів травлення. Окрім цього, катехоламіни порушують процеси росту, моторику та впливають на вірулентність бактерій [133, 148]. Це у свою чергу є фактором активації багатьох процесів – підвищення ПОЛ, експресії прозапальних ферментів (iNOS, ЦОГ-2, 5-ЛОГ), зростання інфільтрації слизової оболонки нейтрофілами, активації їх НАДФН-оксидази, що у подальшому призводить до підвищення продукції ПГЕ₂, кисневих, ліпідних радикалів, пероксинітриду, нітроксили тощо, внаслідок чого активується апоптоз клітин та формуються деструктивні ушкодження [54, 78, 158, 186, 253].

Активація нітрузо-оксидативних процесів за умов дії стресу обумовлена зростанням утворення низки радикалів (супероксидного, гідроксильного, ONOO⁻ тощо) за участю ксантиноксидазної системи, НАДФН-оксидази, ЦОГ-2, iNOS, дія яких викликає каскад ланцюгових реакцій у мембранах клітин, у результаті чого поліненасичені жирні кислоти розщеплюються до малонового диальдегіду, дієнових кон'югатів, а у мітохондріях порушуються процеси біосинтезу АТФ, зазнає змін структура ДНК [83, 157, 186, 188, 196].

У оксидативних механізмах виражену роль відіграє інфільтрація нейтрофілами та моноцитами слизових оболонок органів травлення. Активовані нейтрофіли та моноцити продукують супероксидний аніон, гіпохлоридну кислоту, прозапальні цитокіни (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α), експресують iNOS внаслідок чого зростає вміст NOx та пероксинітриду. Паралельно прозапальні цитокіни активують експресію ЦОГ-2 у клітинах слизових оболонок внаслідок чого зростає синтез ПГЕ₂, експресія ядерного транскрипційного фактора NF- κ B, білка p65 [217].

До останнього часу основна увага дослідників при вивченні дії стресу на органи травлення приділялась СОШ і значно менше тонкій та товстій кишці. Це обумовлено тим, що вплив стресу (водно-іммобілізаційного або екзогенне введення адреналіну) викликає деструктивні ушкодження СОШ у вигляді чисельних ерозій та виразок, що супроводжувалось зростанням нітрузо-оксидативних процесів [2, 28, 78]. У товстій кишці стрес викликає різке зростання її моторики, а також впливає на мікробіоценоз та слизовий бар'єр [5, 13, 28, 37, 38].

На відміну від шлунка, дослідження дії стресу на тонку кишку вивчено недостатньо. Відомо, що стрес є фактором ризику розвитку дуоденальної виразки, підвищує проникність слизового бар'єра тонкої кишки, знижує реабсорбцію води, активує дегрануляцію ентерохромафінних клітин [53].

Нашими дослідженнями показано, що за умов впливу стресу (ВІС та АІС) виражених макроскопічних змін у СОТнК не було виражено. Однак, гістологічно при дії ВІС у СОТнК були відзначені зміни слизового бар'єру, інфільтрація строми ворсинок лейкоцитами та набряк, при цьому висота та ширина ворсинок збільшувалась, що викликає прозапальні зміни.

Нами доведено, що дія стресу (ВІС та АІС) активує нітрузо-оксидативні процеси. Це супроводжується різким зростанням активності iNOS у макрофагах, нейтрофілах, епітеліоцитах та ендотеліоцитах та, відповідно, метаболітів окиснення NO - нітратів та нітритів, тоді як активність sNOS та аргінази у СОТнК знижувалась, у плазмі крові зменшувалась концентрація L-аргініну [20, 21, 29, 112]. Ці зміни взаємопов'язані і обумовлені тим, що з однієї сторони катехоламіни

викликають гіпоксію та продукцію АФК, а з другої – нейтрофіли, які у значній кількості потрапляють з кровоносного русла до міжклітинного простору слизової оболонки, виділяють прозапальні цитокіни (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α), за участю останніх активується експресія iNOS. Якщо за умов норми домінує активність cNOS, то при дії стресу – iNOS, що локалізується у цитоплазмі. Субстратом для iNOS є L-аргінін, що поступає у клітини з крові, внаслідок чого його концентрація у плазмі крові знижується. З L-аргініну за участю iNOS утворюється велика кількість молекул NO, значна кількість його швидко взаємодіє з супероксидним радикалом внаслідок чого утворюється ONOO $^-$, також він зв'язується з амінокислотами, білками, гідроген сульфідом (нітроксил (NO $^-$), нітрозотіоли), що призводить до порушення чисельних процесів у клітині та виникнення структурних змін СОТнК [46, 48, 65, 136, 157, 163, 172, 246].

Слід відзначити, що у літературі стосовно NO, який синтезується різними NO-синтазами за умов норми та запалення, є неоднозначний погляд - вважається, що NO синтезований eNOS грає протективну роль, тоді як NO синтезований iNOS приймає участь у процесах виразкоутворення [59, 136, 157, 189, 245].

Дія стресу призводила до підвищенням рівня процесів ліпопероксидації та активності МПО. Як було вказано вище, за участю ферментів (ксантинооксидази, НАДФН-оксидази, ЦОГ-2, iNOS) утворюються різні радикали, які порушують функції плазматичної мембрани, мітохондрій, ядра. У наших дослідженнях відзначено, що дія стресу викликала зростання вмісту ТБК-активних продуктів за умов ВІС на 44 % ($p < 0,01$), при дії АІС – на 27 % ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи, що свідчило про інтенсифікацію процесів ліпопероксидації. Активність МПО у СОТнК за умов дії різних видів стресу суттєво підвищувалась: при дії ВІС рівень активності МПО збільшився у 5 разів ($p < 0,01$); при АІС - у 3 рази ($p < 0,01$). Враховуючи те, що МПО в основному локалізується у активованих нейтрофілах слизової, які продукують супероксидний радикал та гіпохлорид, зростання активності цього ензима розглядають як один із маркерів запалення.

Дія стресу призводила до зниження вмісту H_2S у плазмі крові. Одним з основних факторів цитопротекції слизової оболонки органів травлення є відповідний рівень кровопостачання, що регулюється за участю декількох чинників, у тому числі H_2S .

Значну роль за умов зростання продукції АФК та інших радикалів відіграє система антиоксидантного захисту. Нами відзначено, що при дії ВІС активність СОД знижувалась на 15 % ($p < 0,05$) та при дії АІС на 7 %. Тоді як, активність каталази у СОТнК при дії ВІС достовірно не змінювалась, в той час як за умов АІС її активність зростала на 20%, порівняно з показниками контрольної групи тварин. Отримані результати з однієї сторони демонструють особливості функціонування СОД та каталази за умов різних моделей стресу, з другої – свідчать про особливості функціонування ензиматичної ланки антиоксидантної системи у різних відділах травної системи [78]. Стрес у слизових оболонках органів травлення викликає неоднозначні зміни активності СОД та каталази. Так, у слизовій оболонці шлунка та товстої кишки за умов дії ВІС або АІС активність СОД та каталази зростала [3, 78]

Вплив стресу також змінює стан мікробіоценозу у порожнинах органів травної системи, у тому числі і тонкої кишки [38, 66]. Нами встановлено, що вплив ВІС призводив до зростання біфідобактерій як у проксимальному, так і дистальному відділах тонкої кишки. Також відзначалась тенденція до зниження кількості лактобактерій у дванадцятипалій кишці за умов стресу. У клубовому відділі тонкої кишки за умов дії 5-годинного ВІС встановлені кількісні зміни умовно-патогенної мікрофлори, що проявлялось зростанням кількості *Escherichia coli* ($p < 0,05$) та клостридій ($p < 0,05$); тоді як достовірних змін кількості ентерококів не відзначалось. Подібні зміни були відзначені при дії ВІС у товстій кишці [38].

Отримані нами результати по впливу стресу (ВІС та АІС) на СОТнК є співзвучними з даними Журомського В.П. [28], Фоменко І.С. [78] та Ємельяненко В.Ю. [13], Насадюк Х.М., Склярів О.Я. [171], Brzozowski B. [158], які проводили дослідження на шлунку та товстій кишці. Особливості

досліджуваних змін полягають у різних рівнях активації iNOS, вмісту ТБК-активних продуктів у СОШ та СОТвК та змін концентрації L-аргініну у плазмі крові, а також функціонуванні ензимів антиоксидантного захисту. Так, у СОШ за умов АІС активність iNOS зростала у 10-11 разів, за умов ВІС – у 4-5 разів; у СОТвК активність iNOS за умов АІС зростала у 5 разів, за умов ВІС – у 4-5 разів. Відповідно, за цих умов знижувалась концентрація L-аргініну у плазмі крові та зростав вміст нітрит-аніону у слизовій.

Отже, дія різних видів стресу (АІС та ВІС) на СОТнК щурів підлягає загальним напрямкам змін нітрузооксидативних процесів, що були відзначені у інших органах травної системи, які були опубліковані раніше. Новим аспектом цього фрагменту роботи є визначення морфологічних (гістологічних, морфометричних) змін та біохімічних прозапальних процесів у СОТнК на основі комплексного підходу.

Іншим важливим чинником, що викликає структурно-геморагічні порушення слизових оболонок органів травлення є застосування НПЗП. Велика кількість неселективних НПЗП (індометацин, напроксен, диклофенак тощо), що взаємодіючи з ЦОГ гальмують синтез ПГ і, у наслідок цього, викликають деструктивні ушкодження слизових оболонок органів травлення та формування НПЗП-викликаної ентеропатії [78, 203].

Виникнення деструктивних ушкоджень при дії неселективних блокаторів ЦОГ пов'язана із зниженням продукції цитопротекторних простагландинів (PGE_1 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$), які забезпечують у слизових оболонках регуляцію кровоплину (вазодилатацію), стимуляцію слизових клітин (підвищення виділення слизу, бікарбонатів, сульфгідрильних груп), інтегративні процеси між клітинами на основі стимуляції/блокування синтезу відповідних місцевих біорегуляторів [123, 254].

Розвиток НПЗП-індукованих ентеропатій має комплексний характер. Окрім пригнічення синтезу цитопротекторних простагландинів, не менш важливим є здатність НПЗП роз'єднювати процеси окисного фосфорилування у мітохондріях ентероцитів, що призводить до зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ. Ці

два чинники можуть призвести до зростання кишкової проникності та, зрештою, до порушення цілісності слизової оболонки [40].

Раніше було відзначено, що ЦОГ-2 є ключовою формою ЦОГ, що відповідає за продукцію ПГЕ₂ у місці запалення. Активують ЦОГ-2 інтерферон- γ , прозапальні цитокіни, фактори росту, бактеріальні ліпополісахариди [163].

Слід відзначити, що ЦОГ-2 ідентифікована у різних клітинах слизової оболонки органів травлення (ентерохромафінних (ЕСL-клітини), парієтальних, епітеліальних, ендотеліальних клітинах, фібробластих, макрофагах) за фізіологічних умов, при ерозивно-виразкових ушкодженнях активність ЦОГ-2 зростала [70, 90, 93, 118, 143].

Нашими дослідженнями було доведено, що блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином викликало розвиток структурно-геморагічних ушкоджень в СОТнК, що переважно проявлялось у порожній кишці; введення селективного інгібітора ЦОГ-2 целекоксибу або інгібітора ЦОГ-2/5ЛОГ сполуки 2A5DHT не призводило до видимих морфологічних змін у СОТнК [17, 78, 117], що узгоджується із даними літератури [181]. При цьому нами було встановлено зниження висоти ворсинок в порожньому відділі за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на 20% ($p < 0,01$) та 24% ($p < 0,01$), відповідно порівняно із значеннями контрольної групи, тоді як блокування ЦОГ-2 призводило до збільшення їх висоти ($p < 0,01$). Ширина ворсинок слизової оболонки порожньої кишки за умов впливу НПЗП різного механізму дії достовірно збільшувалась. Отримані результати свідчать, що різні за структурою та механізмом дії НПЗП викликають специфічні впливи на структурні компоненти ворсинок тонкої кишки (епітеліоцити, нейтрофіли, нервові закінчення, гемокапіляри), які мають різні ПГ рецептори.

Треба відзначити, що блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином або його агоністом SC-560 призводило до виникнення пошкоджень як СОШ, так і СОТнК і це супроводжувалось зниженням продукції ПГЕ₂, тоді як селективний інгібітор ЦОГ-2 целекоксиб не впливав на біосинтез простагландинів, а у СОТнК не відзначались ушкодження [93, 203, 246]. Також було відзначено, що зниження синтезу простагландинів у місці запалення корелювало з блокуванням

активності ЦОГ-1, але не з інгібуванням ЦОГ-2 [71]. У роботах Фоменко І.С. було виявлено, що введення НПЗП різного механізму дії у слизовій оболонці тонкої кишки супроводжувалося розвитком оксидативного стресу, про що свідчило зростання вмісту ТБК-активних продуктів та зниження активності СОД та каталази; було відзначено, що саме інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 (індометацином, напроксеном) викликало різке зростання іNOS та розвиток деструктивних ушкоджень [5, 27].

Морфологічні зміни СОТнК тісно пов'язані з біохімічними процесами. Так, блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2, ЦОГ-2/5-ЛОГ викликало підвищення активності іNOS в СОТнК (у 2 рази, $p < 0,01$; на 55 %, $p > 0,05$; на 51 %, $p > 0,05$, відповідно), тоді як активність сNOS мала тенденцію до зниження, порівняно з показниками контрольної групи тварин, що свідчить про тісний зв'язок між системами ПГ/ЦОГ, ЛТ/ЛОГ та NO-синтазною системою. Паралельно змінам іNOS відбувалось зростання біосинтезу NO та суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в СОТнК, тоді як у плазмі крові зменшувався вміст L-аргініну.

Нами відзначено, що зростання продукції NO за умов дії блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2, ЦОГ-2/5-ЛОГ супроводжується зниженням вмісту H_2S . Це обумовлено тим, що НПЗП окрім блокування активності ЦОГ та пригнічення синтезу простагландинів, також впливають на каталітичну активність ферментів метаболізму H_2S , а саме цистатіонін- γ -ліазу [181].

Вивчення самостійної дії блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ показало зростання концентрації ТБК-активних продуктів у СОТнК (на 17 %, $P < 0,05$; 19 %, $P < 0,05$; 15 %, $P < 0,05$, відповідно), що свідчить про інтенсифікацію процесів ліпопероксидації. Також за умов дії різних досліджуваних НПЗП суттєво зростала активність МПО. Отримані нами результати є співзвучні з даними Fornai M. et al. [181], які показали, що індометацин та диклофенак підвищували вміст МДА та активність МПО у порожній та клубовій кишках на тлі зниження продукції ПГЕ₂, однак за умов їх введення упродовж 14 днів.

Визначення зміни активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД та каталаза) за умов дії різних за механізмом впливу НПЗП свідчить про те, що

активність СОД за умов введення індометацину та дарбуфелону підвищувалась, натомість інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ за умов дії 2A5DHT достовірних змін не було відзначено. Індометацин підвищував активність каталази на 20 % ($p < 0,05$) в СОТнК порівняно з показниками контрольної групи, тоді як застосування целекоксибу та дарбуфелону характеризувалось статистично не достовірними змінами [17, 78, 116].

Між системами ЦОГ/ПГ та NOS/NO існують тісні взаємозв'язки. Як було показано раніше, при розвитку запалення (гіпоксія, порушення балансу між про-та антиоксидантними процесами, продукція прозапальних цитокінів) викликають зростання активності iNOS та активних форм кисню, що призводить до утворення пероксинітриту, який активує ЦОГ та зростає синтез ПГЕ₂ [163]. Блокування активності знижує активність iNOS призводить до зростання ЦОГ.

Отже, отримані нами результати свідчать, що одноразове введення НПЗП різного механізму дії може призводити до порушення функціонування прооксидантної-антиоксидантної рівноваги у СОТнК. Досліджувані НПЗП викликали зростання вмісту ТБК-активних продуктів та активності МПО, паралельно компенсаторно підвищували активність антиоксидантних ензимів у відповідь на надликове утворення АФК.

Важливим питанням було з'ясування морфологічних змін, стану NO-синтазної системи, процесів ПОЛ, активності ензимів антиоксидантного захисту у СОТнК та вмісту H₂S у крові за умов поєднаної дії стресу та НПЗП різного механізму дії. Аналіз гістологічних даних виявив зниження висоти ворсинок в порожньому відділі за умов поєднаної дії стресу та блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ, порівняно з показниками ВІС. При цьому, за умов поєднаної дії стресу та різних за механізмом впливу НПЗП було визначено у різній степені зниження активності iNOS, рівня NO₂⁻ та суми NO₂⁻+NO₃⁻, вмісту ТБК-активних продуктів та паралельне зростання активності cNOS, аргінази, СОД (за умов блокування ЦОГ-2 на 15 % та на 36 % при введенні інгібітора ЦОГ-2/5-ЛОГ) у СОТнК та зростання концентрації L-аргініну в плазмі крові,

порівняно до показників при дії ВІС. Застосування НПЗП на тлі стресу не викликало достовірних змін рівня H_2S порівняно з показниками ВІС [17, 29, 63, 117, 190].

За умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 на фоні стресу нами показана тенденція до збільшення числа ентерококів в проксимальному та дистальному відділі тонкої кишки на тлі відсутності кишкової палички в 12-палій кишці порівняно з показниками ВІС. Слід відзначити, що інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 призводить до зменшення числа ешерихій в клубовій кишці ($p < 0,05$) та збільшення кластридальної мікрофлори в 12-палій кишці ($p < 0,05$) [32].

Аналізуючи роль різних за механізмом впливу НПЗП слід відзначити їх особливості дії за умов розвитку запальних процесів у різних відділах травної системи. Так, за умов розвитку виразкових ушкоджень слизової оболонки товстої кишки блокування ЦОГ-2 целекоксибом проявляло цитопротекторний ефект, при цьому знижувалась активність мієлопероксидази, нейтрофільна інфільтрація, вміст МДА та нітротирозину [44, 61], що свідчить про ульцерогенну дію простагландинів, які синтезуються ЦОГ-2 [211, 255].

Порівнюючи отримані нами результати з даними літератури по дії різних за механізмом дії НПЗП на тлі ВІС у СОШ та СОТвК можна констатувати подібність напряму їх змін, однак у СОТнК проявляються певні особливості нітрозоксидативних процесів [13].

НПЗП широко застосовуються у практичній медицині при лікуванні багатьох патологій, однак негативним аспектом їх дії є гастро- та ентеротоксичність. Враховуючи те, що вживання НПЗП (індометацин, аспірин, диклофенак, кетопрофен) викликає зниження продукції H_2S , який є значним фактором цитопротекції у слизових оболонках травної системи, з метою зниження токсичного впливу неселективних блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 є синтез гібридних сполук шляхом включення H_2S до субстанції НПЗП. Серед таких нових засобів, який у експериментах на тваринах проявив виражений ефект та проходить клінічні випробовування є АТВ-346 ([4-тіокарбамоїл-феніл ефір 2-(6-метоксинафтален-2-іл)-пропіонової кислоти) [230]. Дія АТВ-346 достатньо добре вивчена на різних

моделях ушкодження СОШ та СОТвК, де було показано виражений протизапальний та лікувальний ефект його впливу [64].

Нашими дослідженнями було показано, що модифікований напроксен (АТВ-346) за його одноразового самотійного введення, знижував структурно-морфологічні ушкодження СОТнК у порівнянні з напроксом без H_2S , що супроводжувалось зменшенням активності іNOS, МПО, вмісту ТБК-активних продуктів, нітрит аніону та підвищенням вмісту H_2S у плазмі крові [10].

За умов введення АТВ-346 на тлі стресу відзначено зниження процесів ліпопероксидації, активності МПО та зростання АОС у СОТнК та зростання вмісту H_2S в плазмі крові. Проте зміни системи NO-синтаза/аргіназа достовірно не відрізнялись від показників впливу напроксену за умов ВІС. Слід відзначити, що одноразове введення АТВ-346 на тлі АІС супроводжувалось зниженням активності прозапальних ензимів (іNOS, МПО) та підвищенням активності сNOS, аргінази в СОТнК та вмісту H_2S , L-аргініну в плазмі крові порівняно з показниками поєднаної дії напроксену та стресу, тоді як зміни антиоксидантної системи та рівень ТБК-активних продуктів достовірно не змінювався [10].

Новими є результати, щодо визначення впливу на нітрузо-оксидативні процеси у СОТнК похідних 4-тіазолідинону. Попередніми дослідженнями було відзначено, що похідні 4-тіазолідинону володіють вираженою протівірусною, протимікробною, протипаразитарною, антиоксидантною та протизапальною активністю [11, 41, 137]. Серед цих сполук значну зацікавленість представляють речовини, які відносять до подвійних інгібіторів ЦОГ-2/5-ЛОГ і є подібними за структурою до відомої сполуки дарбуфелон (2-аміно-5-(3,5-дитербутил-4-гідроксибензиліден)-тіазол-4-он).

Нами були використані хімічно модифіковані сірковмісні похідні дарбуфелону (сполуки Les-5054 та Les-5055), як потенційні донори H_2S , при цьому нами досліджувалась їх самотійна дія, вплив на тлі ВІС та на тлі індометацин-індукованої ентеропатії. Самотійна дія похідних 4-тіазолідинону (Les-5055 та Les-5054) не викликало видимих макроскопічних змін СОТнК, при цьому за умов дії Les-5055 підвищувалась активність іNOS, ензимів антиоксидантного захисту та

рівень нітритів і нітратів в СОТнК, паралельно знижувалась активність сNOS, аргінази в СОТнК та концентрації H_2S у плазмі крові. При самостійній дії сполуки Les-5054 відзначалось зростання концентрації H_2S в плазмі крові та активності ензимів антиоксидантної системи (СОД, каталази) в СОТнК. Параметри системи NO-синтаза/аргіназа, концентрація ТБК-активних продуктів були на рівні показників контрольної групи, що може свідчити про знижений ентеротоксичний вплив інгібітора ЦОГ/ЛОГ на СОТнК.

Нами відзначено, що поєднана дія сполуки Les-5054 та стресу викликала зниження активності прозапальних ензимів (iNOS, МПО) та підвищення активності сNOS, аргінази, СОД в СОТнК, та вмісту L-аргініну, H_2S в плазмі крові; паралельно відзначалось зниження процесів ліпопероксидації. Порівнюючи вплив сполук Les-5054 та Les-5055 на тлі дії ВІС на нітрузо-оксидативні процеси слід відзначити більш виражену дію препарату Les-5054.

Дія сполук Les-5054 та Les-5055 на тлі індометацин-індукованої ентеропатії призводило до зменшення площі деструктивних ушкоджень та зниженню активності iNOS, концентрації ТБК-активних продуктів, паралельного підвищення активності сNOS, аргінази у СОТнК та L-аргініну і H_2S у плазмі крові. Сполука Les-5054 проявляла більш виражений вплив на вище вказані процеси.

Новими є результати, щодо дії Les-5054 як на тлі ВІС, так і при індометацин-індукованих ушкодженнях СОТнК, які виявили різке зниження активності МПО. Відомо, що зростання активності МПО є маркером підвищення інфільтрації слизової оболонки нейтрофілами, які продукують гіпохлоридну кислоту та їх НАДФН-оксидаза синтезує значну кількість кисневих радикалів. Сполука Les-5054, яка сприяє вивільненню H_2S , різко знижує активність МПО.

Отже, досліджувані нами похідні 4-тіазолідинону інгібітори ЦОГ-2/5-ЛОГ - Les-5054 та Les-5055, що є потенційними донорами H_2S , проявляють виражену цитопротекторну, протизапальну та антиоксидантну дію, більш вираженим ефектом володіє Les-5054 [111–116].

Механізм протизапальної та антиоксидантної дії сполук Les-5054 та Les-5055 обумовлений декількома факторами. По-перше, важливу роль як антиоксиданта

відіграє H_2S , який у формі гідросульфіда (HS^-) зв'язує різні радикали – ліпідні, кисневі, гіпохлоридну кислоту, пероксинітрит та з іншого боку підвищує рівень глутатіону у цитозолі, мітохондріях та ядрі, а також інгібує активацію ряду цитоплазматичних сигнальних шляхів (NF- κ B, p38 MAPK); по-друге, H_2S є потужним інгібітором адгезії лейкоцитів до судинного ендотелію і, таким чином, активуючи процеси апоптозу або зв'язуючи синтезовану нейтрофілами гіпохлоридну кислоту (HOCl); по-третє, H_2S знижує синтез прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8); по-четвертих, діючи на АТР-чутливі K^+ канали H_2S приймає участь у вазодилатації; по-п'ятих, у органах травної системи H_2S підвищує секрецію епітеліоцитів, покращує кровоплин у слизовій оболонці, знижує лейкоцитарну інфільтрацію [190]. Отже, цитопротекторна дія H_2S у слизовій оболонці є комплексна і включає чисельні внутрішньоклітинні та регуляторні механізми.

Сполуки Les-5054 та Les-5055 за своєю структурою є подібними до блокаторів ЦОГ-2/5-ЛОГ, що викликає зниження продукції прозапальних ПГЕ₂ та ЛТВ₄, які включаються у місцеві механізми запалення.

Отже, отримані нами результати свідчать про цитопротекторну, антиоксидантну та протизапальну дію похідних 4-тіазолідинону, близьких до структури блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ дарбуфелону донорів H_2S сполук Les-5054 та Les-5055. Сполука Les-5054 за умов проведення подальших досліджень може бути потенційним кандидатом до створення нового фармакологічного препарату.

Застосовані нами різні за структурою H_2S вивільняючі речовини - H_2S -вміщуючий напросен та сполука Les-5054 довели те, що при їх введенні концентрація H_2S у плазмі крові зростала і це є одним з ключових факторів цитопротекції.

Отримані нами результати поглиблюють існуючі погляди щодо нітрозоксидативних процесів та морфологічних змін, активності ензимів антиоксидантного захисту та H_2S у біохімічних процесах за умов дії НПЗП різного механізму, їх впливу на тлі стресу у СОТнК; встановлені особливості

цитопротекції при дії нових модифікованих H_2S -вміщуючих речовин при розвитку запалення у СОТнК, що розкриває нові підходи до лікування хворих з НПЗП-індукованими ураженнями органів травлення та створення нових фармацевтичних препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукової задачі щодо з'ясування особливостей впливу різних за механізмом дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ та похідних 4-тіазолідинону, виявлено механізми цитопротекції у слизовій оболонці тонкої кишки та доведено зниження ентеротоксичності шляхом моделювання вмісту гідрогену сульфідіду.

1. Дія стресу (ВІС та АІС) не спричиняла розвиток видимих деструктивних змін СОТнК, проте при гістологічному аналізі фіксували порушення цілісності слизового бар'єра, набряк, що супроводжувалося зростанням активності іNOS утричі та в 2,7 разу ($p < 0,01$), МПО – у 5 і 3 рази ($p < 0,01$), рівня процесів ліпопероксидації – на 44 та 27 % ($p < 0,01$), вмісту нітратів і нітритів – у 2,2 та 2,4 разу ($p < 0,01$); знижувалась активність сNOS на 57 і 41 % ($p < 0,01$) та аргінази. Вміст L-аргініну та H_2S у плазмі крові більш виражено знижувався при ВІС на 63 та 30 % ($p < 0,01$). Дія ВІС призводила до підвищення у клубовому відділі тонкої кишки кількості *Escherichia coli* ($p < 0,05$) та *Clostridium spp.* ($p < 0,05$) і зниження кількості *Bifidobacterium spp* ($p < 0,05$) та ентерококів.

2. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином викликало структурно-геморагічні ураження дистального відділу тонкої кишки, тоді як за умов блокування ЦОГ-2 целекоксибом та ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT макроскопічні морфологічні зміни у СОТнК не визначалися. Як дія індометацину, так і дія целекоксибу та 2A5DHT супроводжувалась різною мірою зростанням активності МПО ($p < 0,05$), процесів ліпопероксидації, вмісту нітритів і нітратів ($p < 0,01$); одночасно зменшувався вміст H_2S ($p < 0,01$) у плазмі крові.

3. Введення блокатора ЦОГ-1/ЦОГ-2 за умов ВІС призводило до виражених деструктивних змін СОТнК, що супроводжувалося руйнуванням слизового бар'єра, десквамацією поверхневого шару епітеліоцитів; інгібування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі дії стресу викликало розвиток набряку в СОТнК. Дія блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі ВІС призводила до зниження активності іNOS ($p < 0,05$), МПО ($p < 0,01$) та вмісту ТБК-активних продуктів ($p < 0,05$), одночасно підвищувався вміст L-аргініну ($p < 0,05$) у плазмі

крові порівняно з показниками ВІС. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі дії ВІС викликало зростання клостридій та ентерококів.

4. За умов дії АТВ-346 (напроксен+H₂S) на тлі ВІС знижувався рівень структурно-морфологічних ушкоджень, знижувалась активність іNOS (на 21 %, p<0,05), МПО (в 1,9 разу, p<0,01), а також вміст ТБК-активних продуктів (на 18 %, p<0,05) у СОТнК, підвищувалась концентрація H₂S (на 56 %, p<0,01) у плазмі крові порівняно з показниками ВІС, що свідчить про цитопротекторний вплив вивільненого H₂S.

5. Введення похідних 4-тіазолідинону як на тлі стресу, так і за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином призводило до зниження активності іNOS (p<0,01), ТБК-активних продуктів (p<0,05), підвищення активності сNOS (p<0,01) у СОТнК та вмісту L-аргініну (p<0,01), H₂S (p<0,01) в плазмі крові. Порівнюючи вплив сполук Les-5055 і Les-5054 на морфологічний стан та нітрузооксидативні процеси у СОТнК, відзначали більш виражену цитопротекторну дію сполуки Les-5054.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Белостоцкий Н. И. Язвеобразование в слизистой оболочке желудка крыс под влиянием катехоламинов. *Патологическая физиология и экспериментальная медицина*. 1988. № 1. С. 24–27.
2. Вплив вітаміну С на антиоксидантні та цитопротекторні процеси в органах травної системи за умов експериментальної виразки шлунка / І. Б. Грюк та ін. *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія*. 2010. № 2. С. 50–56.
3. Вплив вітаміну С на механізми цитопротекції, ліпопероксидації та активність NO-синтаз при стресі та експериментальному коліті у щурів / Н. Р. Шамро та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2011. Т. 3, № 86. С. 159–163.
4. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу / Д. В. Голишкін та ін. *Фізіологічний журнал*. 2015. Т. 61, № 2. С. 65–72.
5. Вплив нестероїдних протизапальних препаратів на стан системи NO-синтаза/аргіназа у товстій кишці за умов стресу / І. С. Фоменко та ін. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2013. №2. С. 207–210.
6. Гаморак Г. П. Профілактика дисбіозу і корекція лактобактерином якісного і кількісного складу мікрофлори дистального відділу тонкої кишки білих щурів, яким протягом 20 днів проводили аплікацію на шкіру ітаконовою кислотою. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2015. Т. 14, № 3. С. 36–44.
7. Гандзюк В. А. Хвороби органів травлення в Україні. Динаміка поширеності та смертності 2002 – 2015 рр. *Science of the XXI century: problems and prospects of researches*. 2017. Т. 3. С. 11–15.
8. Голиков П. П., Матвеев С. Б., Пахомова Г. В. Динамика экскреции конечного продукта оксида азота и нитрита с мочой при перитоните. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999. № 9. С. 11–12.
9. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології: навч. посіб. Житомир: Полісся, 2015. 286 с.

10. Дія H_2S -вмісного напроксену на стан системи NO-синтаза/аргіназа за умов стресу в тонкій кишці / І. І. Ільків та ін. *Медична хімія*. 2014. Т. 16, № 4. С. 18–21.
11. Донори H_2S у створенні інноваційних лікарських засобів / Д. В. Камінський та ін. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*. 2017. Т. 15, № 2. С. 27–46.
12. Дослідження терапевтичних властивостей нових низькомолекулярних органічних сполук на моделях виразкоутворення у щурів / А. Маркевич та ін. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Біологічні науки*. 2014. № 13. С. 159–165.
13. Ємельяненко В. Ю., Фоменко І. С., Склярів О. Я. Зміни активності NO-синтази, аргінази та оксидативних процесів товстої кишки за умов стресу й експериментального коліту. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2013. № 4. С. 19–25.
14. Журавльова Л. В., Олійник, М. О. НПЗП-гастропатії в практиці сімейного лікаря. *Сучасна гастроентерологія*. 2018. №3. С. 48–53.
15. Журомський В. С., Склярів О. Я. Вплив вітаміну С на стан NO-синтазної системи за умов експериментальної виразки шлунка. *Фізіологічний журнал*. 2011. Т. 57, № 2. С. 90–97.
16. Зенков Н. К., Колпаков А. Р., Меньщикова Е. Б. Редокс-чутлива система Keap1/Nrf2/ARE як фармакологічна мішень при серцево-сосудистій патології. *Сибірський научний медичний журнал*. 2015. Т. 35, № 5. С. 5–25.
17. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази/ліпооксигенази у тонкій кишці / І. І. Ільків та ін. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2014. Т. 68, № 4. С. 19–25.
18. Ільків І., Лесик Р., Склярів О. Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан NO-синтазної системи за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 у слизовій оболонці тонкої кишки щурів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016. Т. 73. С. 365.

19. Ільків І. І., Лесик Р. Б., Скляр О. Я. Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів: пат. 108412 Україна. № у 2016 01336; заявл. 15.02.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 12.
20. Ільків І. І., Скляр О. Я. Вплив H₂S-вміщуючого напроксена (АТВ-346) на стан NO-синтазної системи у слизовій оболонці тонкої кишки щурів за умов стресу. *Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів*: мат. XXXI Всеукраїнської науково-практичної конференції, (Харків, 22 травня 2014 р.). Харків: НФаУ, 2014. С. 43.
21. Ільків І. І., Скляр О. Я. Дослідження механізмів цитопротекції похідних 4-тіазолідинону за умов стресу у тонкій кишці. *Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів*: мат. XXXIII Всеукраїнської науково-практичної конференції, (Харків, 08 квітня 2016 р.). Харків: НФаУ, 2016. С. 90.
22. Кіселик І. О., Луцик М. Д., Шевченко Л. Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології. *Лабораторна діагностика*. 2001. № 3. С. 43–45.
23. Малахов В. О., Монастирський В. О. Сучасні уявлення про імунонейроендокринну систему в нормі та при патології. *Новости медицини и фармации. Справочник специалиста*. 2010. № 11-12. С. 331–332.
24. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк и др. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1988. № 4. С. 44–47.
25. Ольховський О. С., Заїчко, Н. В. Вплив пропаргілгліцину та натрію гідрогенсульфіду на вміст H₂S і показники про-антиоксидантної системи в міокарді щурів різного віку. *Медична хімія*. 2013. Т. 15, № 4. С. 10–15.
26. Омельченко О. Є. Аналіз змін мікроциркуляції слизової та підслизової оболонок шлунка та їх зв'язок з ульцерогенезом за умов гострого стресу у щурів з різними типами реагування. *Вісник проблем біології і медицини*. 2013. Т. 1, № 3. С. 126–130.

27. Особливості впливу нестероїдних протизапальних препаратів на показники NO-синтазної системи у слизовій оболонці шлунка щурів за умов стресу / І. С. Фоменко та ін. *Фізіологічний журнал*. 2014. Т. 60, № 2. С. 51–56.
28. Особливості дії вітамінів Е та С у регуляції NO-синтазної системи у слизових оболонках шлунка та товстої кишки за умов стресу / В. С. Журомський та ін. *Медична хімія*. 2009. Т. 11, № 3. С. 18–21.
29. Особливості змін активності системи NO-синтаза/аргіназа в органах травної системи за стресу та блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2/5-ЛОГ / І. С. Фоменко та ін. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. Vol. 86, Special Issue. P. 117.
30. Практична мікробіологія: посіб. / С. І. Климнюк та ін.; Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. 440 с.
31. Раваева М. Ю., Чуян Е. Н. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения. *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского*. 2011. Т. 24, №4. С. 201–210.
32. Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі / І. С. Фоменко та ін. *Фізіологічний журнал*. 2015. Т. 61, № 1. С. 42–49.
33. Свінціцький А. С. НПВП-гастропатія: сучасне становище проблеми. *Кримський терапевтичний журнал*. 2010. Т. 2, № 2. С. 280–286.
34. Складов О. Я., Косий Є. Р., Складов Є. Я. Основи гастроентерології: навч. посіб. / Львів: Кварт, 2011. 289 с.
35. Сукманський О. І., Сукманський І. О. Газотрансміттери – новий вид біорегуляторів. *Журнал НАПН України*. 2014. Т. 20, № 2. С. 153–159.
36. Тимурбулатов М. А. Метод підвищення свободнорадикального окислення ліпидсодержащих компонентів крові и его діагностическое значеніе. *Лабораторное дело*. 1981. № 4. С. 209–211.
37. Фоменко І. С. Роль процесів ліпопероксидації у формуванні виразкових ушкоджень слизової оболонки товстої кишки щурів при різних моделях стресу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Т. 1, № 3. С. 223–226.

38. Характеристика мікрофлори кишечника та зміни по-синтазної системи за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази / А. Р. Гураль та ін. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2014. № 22. С. 117–121.
39. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. *Лаб. дело*. 1991. № 10. С. 9–13.
40. 2,4-Diamino-6-hydroxy pyrimidine inhibits NSAIDs induced nitrosyl-complex EPR signals and ulcer in rat jejunum / S. Somasundaram et al. *BMC gastroenterology*. 2002. Vol. 2, № 1. P. 1–7.
41. 4-Thiazolidinones: the advances continue... / A. C. Tripathi et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 72. P. 52–77.
42. Activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in rat gastric mucosa during stress ulceration / Y. T. Jia et al. *Chinese Journal of Burns*. 2006. Vol. 22, № 5. P. 351–354.
43. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress / J. G. Spiers et al. *Frontiers in neuroscience*. 2015. Vol. 8. P. 1–6.
44. Aggravation of inflammatory bowel disease by cyclooxygenase-2 inhibitors in rats / V. P. Singh et al. *Pharmacology*. 2004. Vol. 72, № 2. P. 77–84.
45. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*. 2004. Vol. 75, № 6. P. 639–653.
46. Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J*. 2001. Vol. 357. P. 593–615.
47. Antioxidant effects of hydrogen sulfide on left ventricular remodeling in smoking rats are mediated via PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2 / X. Zhou et al. *Toxicological Sciences*. 2014. Vol. 144, № 1. P. 197–203.
48. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / G. Wu et al. *Amino Acids*. 2009. Vol. 37, № 1. P. 153–168.
49. Augmentation of cGMP/PKG pathway and colonic motility by hydrogen sulfide / A. D. Nalli et al. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2017. Vol. 313, № 4. P. G330–G341.

50. A wider view on gastric erosion: detailed evaluation of complex somatic and behavioral changes in rats treated with indomethacin at gastric ulcerogenic dose / L. P. Filaretova et al. *Endocrine regulations*. 2014. Vol. 48, № 4. P. 163–172.
51. Barani R., Motalleb G., Maghsoudi H. Evaluation of iNOS Expression in Esophageal Cancer Patients. *Gastrointestinal tumors*. 2016. Vol. 3, № 1. P. 44–58.
52. Bauer V., Sotníková R. Nitric oxide—the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *General physiology and biophysics*. 2010. Vol. 29, № 4. P. 319–340.
53. Bhatia V., Tandon R. K. Stress and the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005. Vol. 20. P. 332–339.
54. Bonaz B. Stress and the Gastrointestinal System. *Neuro-Immuno-Gastroenterology*. Springer International Publishing, 2016. P. 123–156.
55. Bradley P. P., Christensen R. D., Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. 1982. Vol. 60. P. 618–622.
56. Brandtzaeg P. Gate:keeper function of the intestinal epithelium. *Beneficial microbes*. 2013. Vol. 4, № 1. P. 67–82.
57. Bridging the gap between host immune response and intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease: does immunoglobulin A mark the spot? / J. M. Shapiro et al. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2015. Vol. 13, № 5. P. 842–846.
58. Bryan N. S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci*. 2009. Vol. 14, № 1. P. 1–18.
59. Calatayud S., Barrachina D., Esplugues J. V., Nitric oxide: relation to integrity, injury and healing of the gastric mucosa. *Microsc Res Tech*. 2001. Vol. 53, № 5. P. 325–335.
60. Carreau A., Kieda C., Grillon C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Experimental cell research*. 2011. Vol. 317, № 1. P. 29–41.
61. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats / S. Cuzzocrea et al. *Eur J Pharmacol*. 2001. Vol. 431, № 1. P. 91–102.

62. Chandrasekharan N. V., Simmons D. L. The cyclooxygenases. *Genome biology*. 2004. Vol. 5, № 9. 241–247.
63. Changes of nitric oxide system and lipid peroxidation parameters in the digestive system of rats under conditions of acute stress, and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs / I. Fomenko et al. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2015. Vol. 28, № 1. P. 37–41.
64. Chan M. V., Wallace J. L. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013. Vol. 305. P. 467–473.
65. Cho C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology-Paris*. 2001. Vol. 95. P. 253–256.
66. Collins S. M., Surette M., Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*. 2012. Vol. 10, № 11. P. 735–742.
67. Cooper C. E., Brown G. C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2008. Vol. 40, № 5. P. 533–539.
68. Corfield A. P. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2015. Vol. 1850, № 1. P. 236–252.
69. Cornick S., Tawiah A., Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue barriers*. 2015. Vol. 3, № 1-2. P. 1–15.
70. Coruzzi G., Venturi N., Spaggiari S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Diomed*. 2007. Vol. 78, № 2. P. 96–110.
71. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity / J. L. Wallace et al. *Gastroenterology*. 1998. Vol. 115, № 1. P. 101–109.

72. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems / A. Gądek-Michalska et al. *Pharmacological Reports*. 2013. Vol. 65, № 6. P. 1655–1662.
73. Dennis E. A., Norris P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2015. Vol. 15, № 8. P. 511–523.
74. Dey I., Lejeune M., Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British journal of pharmacology*. 2006. Vol. 149, № 6. P. 611–623.
75. Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells / C. Carrasco-Pozo et al. *Chemico-biological interactions*. 2012. Vol. 195, № 3. P. 199–205.
76. Donald J. A. Gasotransmitter Family. *Handbook of Hormones*. Elsevier, 2015. P. 601–602.
77. Dual action of prostaglandin E₂ on gastric acid secretion through different EP receptor subtypes in the rat / S. Kato et al. *Am J Physiol*. 2005. Vol. 289, № 1. P. 64–69.
78. Effects of conventional and hydrogen sulfide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rats with stress-induced and epinephrine-induced gastric damage / I. Fomenko et al. *Stress*. 2014. Vol. 17, № 6. P. 528–537.
79. Emim J., Oliveira A. B., Lapa A. J. Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Duartin and Claussequinone, in Rats and Mice. *Journal of pharmacy and Pharmacology*. 1994. Vol. 46, № 2. P. 118–122.
80. Exogenous and Endogenous Hydrogen Sulfide Protects Gastric Mucosa against the Formation and Time-Dependent Development of Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lesions Progressing into Deeper Ulcerations / M. Magierowski et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22. P. 1–16.
81. Factors involved in upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat small intestine following administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs / K. Takeuchi et al. *Dig Dis Sci*. 2006. Vol. 51. P. 1250–1259.

82. Farrugia G., Szurszewski J. H. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2014. Vol. 147, № 2. P. 303–313.
83. Fink G. Selye's general adaptation syndrome: stress-induced gastro-duodenal ulceration and inflammatory bowel disease. *Journal of Endocrinology*. 2017. Vol. 232, № 3. P. F1–F5.
84. Förstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2011. Vol. 33, № 7. P. 829–837.
85. Foster J. A., Neufeld K. A. M. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*. 2013. Vol. 36, № 5. P. 305–312.
86. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*. 2013. Vol. 17, № 4. P. 1185–1197.
87. Ganguly K., Swarnakar S. Chronic gastric ulceration causes matrix metalloproteinases-9 and-3 augmentation: alleviation by melatonin. *Biochimie*. 2012. Vol. 94, № 12. P. 2687–2698.
88. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing / M. Magierowski et al. *Molecules*. 2015. Vol. 20, № 5. P. 9099–9123.
89. Gasotransmitters in the gastrointestinal tract / M. S. Kasparek et al. *Surgery*. 2008. Vol. 143, № 4. P. 455–459.
90. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase-2 upregulation in rats / M. Komori et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002. Vol. 283, № 6. P. 1368–1378.
91. Geyer J. W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1971. Vol. 39. P. 412–417.
92. Goldstein J. L., Cryer B. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. *Drug, healthcare and patient safety*. 2015. Vol. 7. P. 31–41.

93. Gudis K., Sakamoto C. The Role of Cyclooxygenase in Gastric Mucosal Protection. *Dig Dis Sci*. 2005. Vol. 50, Suppl. 1. P. 16–23.
94. Guo W., Cheng Z. Y., Zhu Y. Z. Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013. Vol. 34, № 10. P. 1284–1291.
95. Gyires K., Feher A. Stress, Neuropeptides and Gastric Mucosa. *Current pharmaceutical design*. 2017. Vol. 23, № 27. P. 3928–3940.
96. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat / L. Li et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. Vol. 47, № 1. P. 103–113.
97. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation / C. Coletta et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109, № 23. P. 9161–9166.
98. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation / M. L. L. Faro et al. *Nitric Oxide*. 2014. Vol. 41. P. 38–47.
99. Hydrogen sulfide: a potential novel therapy for the treatment of ischemia / A. R. Jensen et al. *Shock*. 2017. Vol. 48, № 5. P. 511–524.
100. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels / A. K. Mustafa et al. *Circ. Res*. 2011. Vol. 109. P. 1259–1268.
101. Hydrogen sulfide attenuates gastric mucosal injury induced by restraint water-immersion stress via activation of K_{ATP} channel and NF- κ B dependent pathway / H. Z. Sun et al. *World journal of gastroenterology*. 2017. Vol. 23, № 1. P. 87–92.
102. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent / A. L. King et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. Vol. 111, № 8. P. 3182–3187.
103. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace et al. *The FASEB Journal*. 2007. № 21. P. 4070–4076.
104. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21 / W. J. Cai et al. *Cell biology international*. 2010. Vol. 34, № 6. P. 565–572.

105. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264. 7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide / G. S. Oh et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006. Vol. 41, № 1. P. 106–119.
106. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling / J. W. Calvert et al. *Circulation research*. 2009. Vol. 105, № 4. P. 365–374.
107. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1 β -induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells / S. O. Jeong et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006. Vol. 345, № 3. P. 938–944.
108. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF- κ B dependent anti-inflammation pathway / C. Guo et al. *European journal of pharmacology*. 2014. Vol. 725. P. 70–78.
109. Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulfhydration of Keap1 and activation of Nrf2 / G. Yang et al. *Antioxidants & redox signaling*. 2013. Vol. 18, № 15. P. 1906–1919.
110. Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic / J. L. Wallace et al. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018. Vol. 28, № 16. P. 1533–1540.
111. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Effect of novel 4-thiazolidinone derivatives during COXs inhibition in small intestine of rats. *8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry: Abstract book (18-20 September 2017)*. Lublin, Poland, 2017. P. 21.
112. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Evaluation of novel 4-thiazolidinone-based derivatives as possible cytoprotective agents against stress model in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017. Vol. 7. P. 199–203.
113. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Exploiting hydrogen sulfide of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotection of small intestine under indomethacin-induced injury. *Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference: Abstract book (7-10 April 2016)*. Prague, Czech Republic, 2016. P. 67.

114. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Novel 4-thiazolidinone derivatives as cytoprotective agents against NSAID-induced injury. *24th United European Gastroenterology Week: Abstract book* (17-19 October 2016). Vienna, Austria, 2016. P.A61–A62.
115. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. The influence of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotective mechanisms of small intestine under NSAID-induced damage. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88. P. 99–104.
116. Ilkiv I. I., Lesyk R. B., Sklyarov O. Ya. Cytoprotective effect of novel 4-thiazolidinone derivatives against stress conditions in small intestine of rats. *Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки*. 2017. Т. XLIX, № 1. С. 47.
117. Ilkiv I. I., Sklyarov O. Ya. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the NO-synthase system in the mucosa of small intestine of rats under the stress. *Stress: comprehensive & authentic summer school: Abstract book* (21-25 July 2014). Zagreb, Croatia, 2014. P.46.
118. Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis / A. P. Paiotti et al. *Braz J Med Biol Res*. 2007. Vol. 40, № 7. P. 911–918.
119. Impaired hydrogen sulfide synthesis and IL-10 signaling underlie hyperhomocysteinemia-associated exacerbation of colitis / K. L. Flannigan et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. Vol. 111, № 37. P. 13559–13564.
120. Increased rate of spontaneous bacterial peritonitis among cirrhotic patients receiving pharmacologic acid suppression / G. A. Goel et al. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012. Vol. 10, № 4. P. 422–427.
121. Interactions between nitric oxide and hydrogen sulfide generating systems in gastric mucosa under condition of the combined action of stress and Findaids / I. Fomenko et al. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017. Vol. 7, № 8. P.13–19.
122. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase / Z. Pálinkás et al. *Br J Pharmacol*. 2015. Vol. 172, № 6. P. 1516–1532.

123. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E₂ and EP1 receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach / K. Takeuchi et al. *J Physiol Pharmacol*. 2006. Vol. 57. P. 661–676.
124. Iwakiri Y., Kim M. Y. Nitric oxide in liver diseases. *Trends in Pharmacological sciences*. 2015. Vol. 36, № 8. P. 524–536.
125. Kabil O., Motl N., Banerjee R. H₂S and its role in redox signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2014. Vol. 1844, № 8. P. 1355–1366.
126. Kavanaugh N. L. Impacts of mucins on microbial physiology and interactions: doctoral dissertation / Massachusetts Institute of Technology, 2015. 113 p.
127. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules*. 2014. Vol. 19. P. 16146–16157.
128. Kimura H. Hydrogen Sulfide and Polysulfide Signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2017. Vol. 27, № 10. P. 619–621.
129. Kimura H., Shibuya N., Kimura Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. *Antioxidants & redox signaling*. 2012. Vol. 17, № 1. P. 45–57.
130. Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric oxide*. 2014. Vol. 41. P. 4–10.
131. Koga T., Takehiko Y. Leukotriene B₄ Receptors. *Bioactive Lipid Mediators*. Springer Japan, 2015. P. 85–93.
132. Kolios G., Valatas V., Ward S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*. 2004. Vol. 113, № 4. P. 427–437.
133. Konturek P. C., Brzozowski T., Konturek S. J. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol*. 2011. Vol. 62, № 6. P. 591–599.
134. Kumar S., Singh R. K., Bhardwaj T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 85. P. 182–201.

135. Lahti A., Kankaanranta H., Moilanen E. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *European Journal of Pharmacology*. 2002. Vol. 454, № 2–3. P. 115–123.
136. Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Research & Therapy*. 2008. Vol. 10, Suppl. 2. P. 1–6.
137. Lesyk R. B., Zimenkovsky B. S. 4-Thiazolidones: centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Current Organic Chemistry*. 2004. Vol. 8, № 16. P. 1547-1577.
138. Lee W., Kim H. S., Lee G. R. Leukotrienes induce the migration of Th17 cells. *Immunology and cell biology*. 2015. Vol. 93, № 5. P. 472–479.
139. Levy B. H., Tasker J. G. Synaptic regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2012. Vol. 6. P. 1–13.
140. Li L., Hsu A., Moore P. K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation—a tale of three gases! *Pharmacology & therapeutics*. 2009. Vol. 123, № 3. P. 386–400.
141. Li L., Rose P., Moore P. K. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011. Vol. 51. P. 169–187.
142. Lim Y. J., Chun H. J. Recent advances in NSAIDs-induced enteropathy therapeutics: new options, new challenges. *Gastroenterology research and practice*. 2013. Vol. 2013. P. 1–7.
143. Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats / S. Takahashi et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1998. Vol. 275. P. 1137–1145.
144. Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells / N. Yamakawa et al. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010. Vol. 33, № 3. P. 398–403.
145. Lundberg J. O., Gladwin M. T., Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature reviews Drug discovery*. 2015. Vol. 14, № 9. P. 623–641.

146. Lundberg J.O., Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*. 2013. Vol. 62. P. 616–626.
147. Lutgendorff F., Akkermans L., Soderholm J. D. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Current molecular medicine*. 2008. Vol. 8, № 4. P. 282–298.
148. Lyte M., Vulchanova L., Brown D. R. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell and tissue research*. 2011. Vol. 343, № 1. P. 23–32.
149. Macpherson A. J., Geuking M. B., McCoy K. D. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol*. 2012. Vol. 33, № 4. P. 160–167.
150. Macpherson A. J., Köller Y., McCoy K. D. The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends in immunology*. 2015. Vol. 36, № 8. P. 460–470.
151. Markers of inflammation and influence of nitric oxide on platelet activation in the course of ulcerative colitis / B. Gawrońska et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 40. P. 68108–68114.
152. Martín A. R., Villegas I., de la Lastra C. A. The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. *Inflamm Res*. 2005. Vol. 54, № 4. P. 145–151.
153. Martínez-Colón G. J., Moore B. B. Prostaglandin E₂ as a Regulator of Immunity to Pathogens. *Pharmacology & therapeutics*. 2018. Vol. 185. P. 135–146.
154. Martínez-Ruiz A., Cadenas S., Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011. Vol. 51, № 1. P. 17–29.
155. Mastorakos G., Pavlatou M. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Hormone and Metabolic Research*. 2005. Vol. 37, № 9. P. 577–584.
156. Mattila J. T., Thomas A.C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol*. 2014. Vol.5. P. 1–5.
157. McCafferty D. M. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut*. 2000. Vol. 46, № 3. P. 436–439.

158. Mechanisms by which stress affects the experimental and clinical inflammatory bowel disease (IBD): role of brain-gut axis / B. Brzozowski et al. *Current neuropharmacology*. 2016. Vol. 14, № 8. P. 892–900.
159. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from non-steroidal anti-inflammatory drugs / I. Bjarnason et al. *Gastroenterology*. 2018. Vol. 154, № 3. P. 500–514.
160. Metabolism of hydrogen sulfide (H₂S) and Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase / K. R. Olson et al. *Redox biology*. 2017. Vol. 15. P. 74–85.
161. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages / M. Rath et al. *Frontiers in immunology*. 2014. Vol. 5. 1–10.
162. Microbiota Plays a Key Role in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage / K. Otani et al. *Digestion*. 2017. Vol. 95, № 1. P. 22–28.
163. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors / V. Mollace et al. *Pharmacol Rev*. 2005. Vol. 57. P. 217–252.
164. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF-κB and Nrf2 / C. Carrasco-Pozo et al. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2016. Vol. 24. P. 289–298.
165. Mosińska P., Salaga M., Fichna J. The Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Gastrointestinal Disorders. *Gastrointestinal Tissue*. Academic Press, 2017. P. 53–64.
166. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome / L. E. Tailford et al. *Frontiers in genetics*. 2015. Vol. 6. P. 1–18.
167. Mustafa A. K., Gadalla M. M., Snyder S. H. Signaling by gasotransmitters. *Science signaling*. 2009. Vol. 2, № 68. P. 1–8.
168. Musumba C., Pritchard D. M., Pirmohamed M. Cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2009. Vol. 30, № 6. P. 517–531.

169. Naik E., Dixit V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*. 2011. Vol. 208, № 3. P. 417–420.
170. Napoli C., Ignarro L. J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch. Pharm. Res.* 2009. Vol. 32. P. 1103–1108.
171. Nasadyuk C., Sklyarov A. Thymohexin exhibits cytoprotective effect in experimental gastric lesions in rats both through the inhibition of inducible nitric oxide synthase and reduction of oxidative mucosal damage. *Regul. Pept.* 2013. Vol. 80. P. 50–57.
172. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest.* 1997. Vol. 100. P. 2417–2423.
173. New developments in goblet cell mucus secretion and function / G. M. Birchenough et al. *Mucosal immunology*. 2015. Vol. 8, № 4. P. 712–719.
174. Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells / H. C. Um et al. *Nitric Oxide*. 2011. Vol. 25, № 2. P. 161–168.
175. Nitric oxide and hydrogen sulfide interact when modulating gastric physiological functions in rodents / L. T. Lucetti et al. *Digestive diseases and sciences*. 2017. Vol. 62, № 1. P. 93–104.
176. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system / J. Lei et al. *Nitric Oxide*. 2013. Vol. 35. P. 175–185.
177. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease / V. Shah et al. *Gastroenterology*. 2004. Vol. 126, № 3. P. 903–913.
178. Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation / P. T. Doulias et al. *Science signaling*. 2013. Vol. 6, № 256. P. 1–12.
179. NO• Binds Human Cystathionine β -Synthase Quickly and Tightly / J. B. Vicente et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, № 12. P. 8579–8587.
180. Nonsteroidal anti-inflammatory drug induces proinflammatory damage in gastric mucosa through NF- κ B activation and neutrophil infiltration: Anti-inflammatory role

- of heme oxygenase-1 against nonsteroidal anti-inflammatory drug / S. Bindu et al. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013. Vol. 65. P. 456–467.
181. NSAID-induced enteropathy: are the currently available selective COX-2 inhibitors all the same? / M. Fornai et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014. Vol. 348, № 1. P. 86–95.
182. Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe? *Chemico-biological interactions*. 2014. Vol. 217. P. 49–56.
183. Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta*. 2015. Vol. 439. P. 212–218.
184. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases / I. Soufli et al. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2016. Vol. 7, № 3. P. 353–360.
185. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya et al. *Physiological reviews*. 2014. Vol. 94, № 2. P. 329–354.
186. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in a normal colon epithelial cell line / N. Packiriswamy et al. *World journal of gastroenterology*. 2017. Vol. 23, № 19. P. 3427–3439.
187. Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine β -synthase mediated by Lon protease / H. Teng et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. Vol. 110, № 31. P. 12679–12684.
188. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007. Vol. 87, № 1. P. 315–424.
189. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury / P. L. Beck et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004. Vol. 286, № 1. P. 137–147.
190. Peculiarities of the changes of NO-synthase/arginase system in digestive organs under the conditions of stress and COX-1/COX-2, COX-2/5-LOX blockage / I. Fomenko et al. *The 8th symposium on cell/tissue injury and*

- cytoprotection/organoprotection*: Abstract book (24-26 September 2014). Budapest, Hungary, 2014. P.1654.
191. Perini R., Fiorucci S., Wallace J. L. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury and repair: A window of opportunity for cyclooxygenase-inhibiting nitric oxide donors. *Can J Gastroenterol*. 2004. Vol. 18, № 4. P. 229–236.
192. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway / D. Perez-Sala et al. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001. Vol. 280, № 3. P. F466–F473.
193. Predmore B. L., Lefer D. J., Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal*. 2012. Vol.17, № 1. P. 119–140.
194. Protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* 231 against N-MethylN'-nitro-N-nitrosoguanidine in animal model / V. Gosai et al. *Gut Microbes*. 2011. Vol. 2, № 6. P. 319–325.
195. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis / J. L. Wallace et al. *Gastroenterology*. 2011. Vol. 141, № 4. P. 1314–1322.
196. Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling / K. Yoshikawa et al. *Journal of gastroenterology*. 2017. Vol. 52, №1. P. 61–71.
197. Psychological stress increases risk for peptic ulcer, regardless of *Helicobacter pylori* infection or use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs / S. Levenstein et al. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2015. Vol. 13, № 3. P. 498–506.
198. Psychological stress-induced colonic barrier dysfunction: Role of immune-mediated mechanisms / P. Hattay et al. *Neurogastroenterology & Motility*. 2017. Vol. 29, № 7. e13043.
199. Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells / K. Scheschowitsch et al. *Pharmacological research*. 2015. Vol. 100. P. 73–84.

200. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase / A. Pautz et al. *Nitric oxide*. 2010. Vol. 23, № 2. P. 75–93.
201. Regulatory mechanism of duodenal bicarbonate secretion: Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide / K. Takeuchi et al. *Pharmacol Ther*. 2011. Vol. 130, № 1. P. 59–70.
202. Reiche E. M. V., Nunes S. O. V., Morimoto H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. *The lancet oncology*. 2004. Vol. 5, № 10. P. 617–625.
203. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events / A. Tanaka et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002. Vol. 303, № 3. P. 1248–1254.
204. Role of Oxidative Stress in Necrotizing Enterocolitis: Advances and Possibilities for Future Therapy / M. S. Joshi et al. *Gastrointestinal Tissue*. Academic Press, 2017. P. 161–172.
205. Roos K. L. T., Simmons D. L. Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005. Vol. 338, № 1. P. 62–69.
206. Rouzer C. A., Marnett L. J. Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chemical reviews*. 2011. Vol. 111, № 10. P. 5899–5921.
207. Ruth F., Itzhaki D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry*. 1964. Vol. 9, № 4. P. 401–410.
208. Salvemini D., Kim S. F., Mollace V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2013. Vol. 304, № 7. P. R473–R487.
209. Segerstrom S. C., Miller G. E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological bulletin*. 2004. Vol. 130, № 4. P. 601–630.

210. Szabo C. A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: from environmental toxin to biological mediator. *Biochemical pharmacology*. 2017. Vol.149. P. 5–19.
211. Shafiq N., Malhotra S., Pandhi P. Comparative gastrointestinal toxicity of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Indian J. Exp. Biol.* 2005. Vol. 43, № 7. P. 614–619.
212. Shahani N., Sawa A. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants & redox signaling*. 2011. Vol. 14, № 8. P. 1493–1504.
213. Shin V. Y., Kwong A. Prostaglandin and Its Receptors: Potential Targets for Gastrointestinal Inflammation and Cancer. *Therapeutic Targets for Inflammation and Cancer: Novel Therapies for Digestive Diseases*. World Scientific, 2017. P. 295–308.
214. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer / B. B. Aggarwal et al. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009. Vol. 1171, № 1. P. 59–76.
215. Simmonds M. J., Detterich J. A., Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology*. 2014. Vol. 51, № 2-3. P. 121–134.
216. Simmons D. L., Botting R. M., Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*. 2004. Vol. 56, № 3. P. 387–437.
217. Siomek A. NF-κB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol.* 2012. Vol. 59, № 3. P. 323–331.
218. Slominski A. T., Zmijewski M. A. Glucocorticoids Inhibit Wound Healing: Novel Mechanism of Action. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017. Vol. 137, № 5. P. 1012–1014.
219. Streeter E., Ng H. H., Hart J. L. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor. *Medical gas research*. 2013. Vol. 3. P. 1–7.
220. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment / S. D. Silva et al. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2014. Vol. 307, № 4. P. G420–G429.

221. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors / Y. Taché et al. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001. Vol. 280, № 2. P. G173–G177.
222. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids / N. C. Nicolaides et al. *Neuroimmunomodulation*. 2015. Vol. 22, № 1-2. P. 6–19.
223. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract / C. Robbe et al. *Biochemical Journal*. 2004. Vol. 384, № 2. P. 307–316.
224. Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathionine- β -synthase / M. Yamanishi et al. *Journal of inorganic biochemistry*. 2006. Vol. 100, № 12. P. 1988–1995.
225. Synthesis and antitumor activity of ATB-429 derivatives containing a nitric oxide-releasing moiety / C. Wang et al. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016. Vol. 26, № 9. P. 2355–2359.
226. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals / G. Caliendo et al. *Journal of medicinal chemistry*. 2010. Vol. 53, № 17. P. 6275–6286.
227. Takagi K., Okabe S. Experimental stress and ulceration. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1968. Vol. 18, № 1. P. 918–924.
228. Takeuchi K., Amagase K. Roles of prostaglandin E and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Archives of Digestive Disorders*. 2017. Vol 1, № 2. P. 8–16.
229. Takeuchi K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E₂: Relationship to EP receptor subtypes. *J Physiol Pharmacol*. 2014. Vol. 65. P. 3–14.
230. The effect of hydrogen sulfide-releasing naproxen (ATB-346) versus naproxen on formation of stress-induced gastric lesions, the regulation of systemic inflammation, hypoxia and alternations in gastric microcirculation / M. Magierowski et al. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2017. Vol. 68, №5. 749–756.
231. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems / M. Carabotti et al. *Annals of gastroenterology: quarterly*

- publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*. 2015. Vol. 28, № 2. P. 203–209.
232. The intestinal mucus layer is a critical component of the gut barrier that is damaged during acute pancreatitis / J. E. Fishman et al. *Shock*. 2014. Vol. 42, № 3. P. 264–270.
233. The NF- κ B p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription / P. S. Simon et al. *BMC cancer*. 2015. Vol. 15. P. 1–12.
234. The relationship between proton pump inhibitor use and longitudinal change in bone mineral density: a population-based from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos) / L. E. Targownik et al. *The American journal of gastroenterology*. 2012. Vol. 107, № 9. P. 1361–1369.
235. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis / N. K. Chokshi et al. *Seminars in perinatology*. 2008. Vol. 32, № 2. P. 92–99.
236. The role of stress in inflammatory bowel diseases / D. Sgambato et al. *Current pharmaceutical design*. 2017. Vol. 23, № 27. P. 3997–4002.
237. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators / V. Capra et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015. Vol. 1851, № 4. P. 377–382.
238. Tumor necrosis factor- α -induced colitis increases NADPH oxidase 1 expression, oxidative stress, and neutrophil recruitment in the colon: preventive effect of apocynin / S. Mouzaoui et al. *Mediators of inflammation*. 2014. Vol. 2014. P. 1–15.
239. Use of a balanced dual cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase inhibitor in experimental colitis / G. Pallio et al. *European journal of pharmacology*. 2016. Vol. 789. P. 152–162.
240. Vascular actions of relaxin: nitric oxide and beyond / C. H. Leo et al. *British journal of pharmacology*. 2017. Vol. 174, № 10. P. 1002–1014.
241. Vine C. E., Cole J. A. Unresolved sources, sinks, and pathways for the recovery of enteric bacteria from nitrosative stress. *FEMS microbiology letters*. 2011. Vol. 325, № 2. P. 99–107.

242. Vuda M., Kamath A. Drug induced mitochondrial dysfunction: Mechanisms and adverse clinical consequences. *Mitochondrion*. 2016. Vol. 31. P. 63–74.
243. Wallace J. L., Ferraz J. G. P., Muscara M. N. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. *Antioxidants & redox signaling*. 2012. Vol. 17. P. 58–67.
244. Wallace J. L., Ianaro A., de Nucci G. Gaseous mediators in gastrointestinal mucosal defense and injury. *Digestive diseases and sciences*. 2017. Vol. 62, № 9. P. 2223–2230.
245. Wallace J. L., Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med* 2001. Vol. 226, № 11. P. 1003–1015.
246. Wallace J. L., Miller M. J. S. Nitric oxide in mucosal defense. A little goes a long-way. *Gastroenterology*. 2000. Vol. 119. P. 512–520.
247. Wallace J. L., Motta J. P., Buret A. G. Hydrogen Sulfide: An Agent of Stability at the Microbiome-Mucosa Interface. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2018. Vol. 314, № 2. P. G143–G149.
248. Wallace J. L. Prevention of NSAID-enteropathy: a soluble problem? *Digestive Diseases and Sciences*. 2016. Vol. 61, № 1. P. 1–3.
249. Wallace J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiological reviews*. 2008. Vol. 88, № 4. P. 1547–1565.
250. Wallace, J. L., Vong L., McKnight W. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology*. 2009. Vol. 137. P. 569–578.
251. Wallace J.L., Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov*. 2015. Vol. 14, № 5. P. 329–345.
252. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological reviews*. 2012. Vol. 92, № 2. P. 791–896.
253. Weidinger A., Kozlov A. V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*. 2015. Vol. 5, № 2. P. 472–484.

254. Willoughby D. A., Moore A. R., Colville-Nash P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*. 2000. Vol. 355, № 9204. P. 646–648.
255. Zhang L., Lu Y. M., Dong X. Y. Effects and mechanism of the selective COX-2 inhibitor, celecoxib, on rat colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *Chin J Dig Dis*. 2004. Vol. 5, № 3. P. 110–114.

ДОДАТКИ
ДОДАТОК А



ДОДАТОК Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
 Проректор з наукової роботи
 проф. _____
 Керівник установи, в якій впроваджена пропозиція
 “ЗІ” _____ 2018 р.
 гербова печатка

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів дисертаційної роботи
Ільків Ірини Ігорівни
“ Роль системи NO-синтаза/аргіназа та моделювання синтезу гідрогену
сульфіду за умов стресу та блокування циклооксигенази у слизовій
оболонці тонкої кишки ”

Ми, що нижче підписалися, члени комісії: завідувач кафедри біохімії та медичної хімії, д.б.н. доц. Маслак А. С., д.б.н. проф. Бразалук О.З., д.б.н. проф. Шевцова А.І., склали даний акт про те, що на кафедрі біохімії у 2017 році були впроваджені в навчальний процес дані дисертаційної роботи здобувача Ільків Ірини Ігорівни.

У курс лекцій з біохімії для студентів II курсу медичних факультетів впроваджено дані щодо ролі гідроген сульфід, а також інгібування циклооксигеназ у процесах ліпопероксидації та системи оксиду азоту у слизовій оболонці тонкої кишки.

Джерело інформації:

1. The influence of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotective mechanisms of small intestine under NSAID-induced damage / I. Ilkiv, R. Lesyk, O. Sklyarov // Ukr Biochem J. – 2016. – Vol. 88 Special Issue. – P. 99-104.
2. Evaluation of novel 4-thiazolidinone-based derivatives as possible cytoprotective agents against stress model in rats / I. Ilkiv, R. Lesyk, O. Sklyarov // J. App. Pharm. Sci. – 2017. – Vol. 7. – P. 199-203.

Голова комісії _____ д.б.н., доц. Маслак А.С.

Члени комісії _____ д.б.н., проф. Бразалук О.З.

_____ д.б.н., проф. Шевцова А.І.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
 результатів дисертаційної роботи
 Ільків Ірини Ігорівни

**“ Роль системи NO-синтаза/аргіназа та моделювання синтезу гідрогену
 сульфідів за умов стресу та блокування циклооксигенази у слизовій
 оболонці тонкої кишки ”**

Ми, що нижче підписалися, члени комісії: проф., д.б.н. Загайко А.Л. склали даний акт про те, що на кафедрі біологічної хімії Національного фармацевтичного університету у 2015 році впроваджені в навчальний процес дані дисертаційної роботи Ільків Ірини Ігорівни.

У курс лекцій з біохімії травлення для студентів III курсу фармацевтичного факультету впроваджено дані щодо ролі газових медіаторів – нітрогену оксиду та гідрогену сульфідів в механізмах стрес-індукованого ульцерогенезу при блокуванні циклооксигенази в слизовій оболонці шлунка.
 Джерело інформації:

1. Ільків І.І., Білецька Л.П., Панасюк Н.Б., Склярів О.Я. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази/ліпооксигенази у тонкій кишці // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2014. - № 4. - С. 19-25.
2. Фоменко І.С., Корнійчук О.П., Гураль А.Р., Шикун Р.Г., Ільків І.І., Склярів О.Я. Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі // Фізіологічний журнал. – 2015. – т. 61, № 1. – С. 42-49.

Голова комісії _____ проф., д.б.н. Загайко А.Л.

підпис

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
 Проректор науково-педагогічної роботи
 НМУ імені О.О. Богомольця
 доц. СТЕЧЕНКО О.В.

“ 18 ” 08 2018 р.
 гербова печатка

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів дисертаційної роботи
Ільків Ірини Ігорівни
“ Роль системи NO-синтаза/аргіназа та моделювання синтезу гідрогену
сульфіду за умов стресу та блокування циклооксигенази у слизовій
оболонці тонкої кишки ”

Ми, що нижче підписалися, члени комісії: завідувач кафедри біохімії д.мед.н., проф. Л.В.Гайова, к.хім.н., доц. Е.Г. Привалко, к.б.н., доц. Яніцька Л.В. склали даний акт про те, що на кафедрі біохімії у 2016-2017 роках були впроваджені в навчальний процес дані дисертаційної роботи здобувача Ільків Ірини Ігорівни.

У курс лекцій з біохімії для студентів II курсу медичного факультету впроваджено дані про зміни нітрузо-оксидативних процесів у слизових оболонках органів травлення за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та корегуючий вплив похідних 4-тіазолідинону.

Джерело інформації:

1. Пат. 108412 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб зниження улцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів / І.І. Ільків, Р.Б. Лесик, О.Я. Склярів; заявник і патентовласник ЛНМУ імені Данила Галицького - № u201601336; заявл. 15.02.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл. №12.
2. The influence of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotective mechanisms of small intestine under NSAID-induced damage / I. Ilkiv, R. Lesyk, O. Sklyarov // Ukr Biochem J. – 2016. – Vol. 88 Special Issue. – P. 99-104.

Голова комісії *Л.В. Гайова* д.мед.н., проф. Гайова Л.В.

Члени комісії *Е.Г. Привалко* к.хім.н., доц. Привалко Е.Г.

Л.В. Яніцька к.б.н., доц. Яніцька Л.В.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Перший проректор

ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія»
проф. Бобирьов В.М.

2017 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріали дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Назва пропозиції для впровадження: Роль системи NO-синтаза/аргіназа та моделювання синтезу гідрогену сульфідів за умов стресу та блокування циклооксигенази у слизовій оболонці тонкої кишки

2. Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. Здобувач наукового ступеня – Ільків Ірина Ігорівна.

3. Джерела інформації: 1. Ільків І.І., Білецька Л.П., Панасюк Н.Б., Склярів О.Я. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази/ліпооксигенази у тонкій кишці // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2014. - № 4. - С. 19-25.

2. Ільків І.І., Білецька Л.П., Панасюк Н.Б., Склярів О.Я. Дія H₂S-вміщуючого напроксену на стан системи NO-синтаза/аргіназа за умов стресу у тонкій кишці // Медична хімія. – 2014. – т. 16, № 4. - С. 18-22.

4. Впроваджено: на кафедрі медичної, біоорганічної та біологічної хімії ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія», Полтава.

5. Включено: в лекційний курс і практичні заняття з біологічної хімії.

Результати впровадження: У лекційно та практичні заняття по темі «Біохімія травної системи» для студентів II курсу медичного та стоматологічного факультетів впроваджено дані щодо ролі систем NO-синтаза/аргіназа, циклооксигенази/простагландини, ліпооксигенази/лейкотрієни в біохімічних механізмах цитопротекції та ульцерогенезу в слизовій оболонці тонкої кишки.

6. Термін впровадження: 2015 рік.

7. Базова установа, яка здійснює впровадження: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися.

Протокол №11 від 22.04.2015р.

Відповідальний за впровадження
завідувач кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії
ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія»,
доктор медичних наук, професор

К.С. Непорада



З. Г. Бойко

ДОДАТОК В**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Ільків І. І., Панасюк Н. Б., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази/ліпооксигенази у тонкій кишці. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2014. Т. 68, № 4. С. 19–25. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, брала участь у підготовці статті до друку).*

2. Ільків І. І., Панасюк Н. Б., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Дія H₂S-вмісного напроксену на стан системи NO-синтаза/аргіназа за умов стресу в тонкій кишці. Медична хімія. 2014. Т. 16, № 4. С. 18–21. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, брала участь у підготовці статті до друку).*

3. Fomenko I., Bondarchuk T., Emelyanenko V., Denysenko N., Sklyarov P., Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov A. Changes of nitric oxide system and lipid peroxidation parameters in the digestive system of rats under conditions of acute stress, and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2015. Vol. 28, No 1. P. 37–41. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, брала участь у підготовці статті до друку).*

4. Фоменко І. С., Корнійчук О. П., Гураль А. Р., Шикула Р. Г., Ільків І. І., Склярів О. Я. Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі. Фізіологічний журнал. 2015. Т. 61, № 1. Р. 42–49. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, брала участь у підготовці статті до друку).*

5. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. The influence of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotective mechanisms of small intestine under NSAID-induced damage. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016. Vol. 88, Special Issue. P. 99–104. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала публікацію до друку).*

6. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Evaluation of novel 4-thiazolidinone-based derivatives as possible cytoprotective agents against stress model in rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2017. Vol. 7. P. 199–203. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала публікацію до друку).*

7. Ільків І. І., Лесик Р. Б., Склярів О. Я. Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів: пат. 108412 Україна. № u 2016 01336; заявл. 15.02.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 12. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, провела оформлення патенту).*

8. Ільків І. І., Склярів О. Я. Вплив H₂S-вміщуючого напроксена (АТВ-346) на стан NO-синтазної системи у слизовій оболонці тонкої кишки щурів за умов стресу. Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали XXXI Всеукраїнської науково-практичної конференції, (Харків, 22 травня 2014 р.). Харків: НФаУ, 2014. С. 43. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

9. Ilkiv I. I., Sklyarov O. Ya. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the NO-synthase system in the mucosa of small intestine of rats under the stress. Stress: comprehensive & authentic summer school: Abstract book (21-25 July 2014). Zagreb, Croatia, 2014. P. 46. *(Дисертантка*

проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).

10. Фоменко І. С., Панасюк Н. Б., Бондарчук Т. І., Денисенко Н. В., Ільків І. І., Склярів П. О., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Особливості змін активності системи NO-синтаза/аргіназа в органах травної системи за стресу та блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2/5-ЛОГ. The Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86, Special Issue. P. 117. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, брала участь у написанні тез).*

11. Fomenko I. S., Panasyuk N. B., Ilkiv I. I., Bondarchuk T. I., Sklyarov P. A., Yemelyanenko V. Y., Denisenko N. V., Biletska L. P., Sklyarov A. Y. Peculiarities of the changes of NO-synthase/arginase system in digestive organs under the conditions of stress and COX-1/COX-2, COX-2/5-LOX blockage. The 8th symposium on cell/tissue injury and cytoprotection/organoprotection: Abstract book (24-26 September 2014). Budapest, Hungary, 2014. P. 1654. *(Дисертантка провела визначення активності ензимів NOS, виконала аналіз одержаних результатів, брала участь у написанні тез).*

12. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Exploiting hydrogen sulfide of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotection of small intestine under indomethacin-induced injury. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference: Abstract book (7-10 April 2016). Prague, Czech Republic, 2016. P. 67. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

13. Ільків І. І., Склярів О. Я. Дослідження механізмів цитопротекції похідних 4-тіазолідинону за умов стресу у тонкій кишці. Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали XXXIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (Харків, 8 квітня 2016 р.). Харків: НФаУ, 2016. С. 90. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

14. Ільків І., Лесик Р., Склярів О. Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан NO-синтазної системи за умов інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 у слизовій оболонці тонкої кишки щурів. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016. Т. 73. С. 365. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

15. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Novel 4-thiazolidinone derivatives as cytoprotective agents against NSAID-induced injury. 24th United European Gastroenterology Week: Abstract book (17-19 October 2016). Vienna, Austria, 2016. P. A61-A62. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

16. Ilkiv I., Lesyk R., Sklyarov O. Effect of novel 4-thiazolidinone derivatives during COXs inhibition in small intestine of rats. 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry: Abstract book (18-20 September 2017). Lublin, Poland, 2017. P. 21. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

17. Ilkiv I. I., Lesyk R. B., Sklyarov O. Ya. Cytoprotective effect of novel 4-thiazolidinone derivatives against stress conditions in small intestine of rats. Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки. 2017. Т. XLIX, № 1. С. 47. *(Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз одержаних результатів, статистично їх опрацювала, підготувала тези).*

ДОДАТОК Г
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. XXXI Всеукраїнська науково-практична конференція «Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, Україна, 22 травня 2014) – стендова доповідь і публікація;
2. Stress: comprehensive & authentic summer school (Zagreb, Croatia, 21-25 July 2014) – усна доповідь і публікація;
3. The 8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Budapest, Hungary, 24-26 September 2014) – стендова доповідь і публікація;
4. XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, Україна, 24-26 травня 2015) – усна доповідь;
5. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference (Prague, Czech Republic, 7-10 April 2016) – усна доповідь і публікація;
6. International scientific conference “Current problems of modern biochemistry”, dedicated to the 100th anniversary of professor Borys Fedorovych Sukhomlynov (Львів, 16-18 листопада 2016) – усна доповідь;
7. XXXIII Всеукраїнська науково-практична конференція “Ліки-людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів” (Харків, Україна, 08 квітня 2016) – стендова доповідь;
8. 24th United European Gastroenterology Week (Austria, Vienna, 17-19 October 2016) – усна доповідь і публікація;
9. Конференція Львівського відділення Українського біохімічного товариства і біохімічної комісії НТШ (Львів, Україна, 2017) – усна доповідь;
10. 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Люблін, Польща, 18-20 September 2017) – стендова доповідь і публікація;
11. #SMARTLION2017 1st Symposium Medicine UpDate (Львів, Україна, 5-6 жовтня 2017) – усна доповідь і публікація.