

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

**ЛОЗИНСЬКА ІРИНА ІГОРІВНА**

УДК: 612.33.014.484/.015.113–019:546.222

**РОЛЬ СИСТЕМИ NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА ЗА УМОВ БЛОКУВАННЯ  
ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ВМІСТУ ГІДРОГЕНУ  
СУЛЬФІДУ ПРИ СТРЕСІ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОНКОЇ КИШКИ**

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

**Науковий керівник** – доктор медичних наук, професор  
**Склярів Олександр Якович**,  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького МОЗ України,  
завідувач кафедри біологічної хімії.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Савчук Олексій Миколайович**,  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка МОН України,  
завідувач кафедри біохімії Навчально-наукового центру  
«Інститут біології та медицини»;

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Салига Юрій Тарасович**,  
Інститут біології тварин НААН,  
завідувач лабораторії обміну речовин  
імені Степана Гжицького.

Захист відбудеться «18» грудня 2018 року о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 в Інституті біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий «38» листопада 2018 року

**Вчений секретар**  
спеціалізованої вченої ради



**О. І. Віщур**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Серед чинників, які відіграють ключову роль у розвитку деструктивних ушкоджень органів травної системи, відзначають вплив психоемоційного стресу та застосування нестероїдних протизапальних препаратів (Журавльова Л. В., 2018; Brzozowski B., 2016; Yoshikawa K., 2017). 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 (Bjarnason I., 2017; Takeuchi K., 2017).

Зміни активності NO-синтазної системи та оксидативних процесів лежать у механізмах розвитку деструктивних ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки (Скляр О. Я. зі співавт., 2017; Gawrońska B., 2017; Packiriswamy N., 2017). У механізмах цитопротекції органів травної системи бере участь  $H_2S$ , впливаючи на процеси мікрогемодинаміки, секреції, мікробіоценозу та регулюючи міжклітинну комунікацію (Kimura H., 2017; Wallace J. L., 2017; Shabo C., 2018).

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 сульфідру (Лесик Р. Б. зі співавт., 2017; Wang C., 2016; Kumar S., 2017; Wallace J. L., 2017).

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 нітрозо-оксидативних процесів (Фоменко І. С., 2015; Gyires K., 2017; Magierowski M., 2017). 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 (Hattay P., 2017; Sgambato D., 2017; Fink G. 2017). Недостатньо вивчено роль газових медіаторів (NO,  $H_2S$ ) 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). Дисертантка дослідила стан NO-синтазної системи, активність ензимів антиоксидантного захисту, рівень процесів ліпопероксидації у СОТнК і рівень L-аргініну, гідрогену сульфідру ( $H_2S$ ) 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 щурів і зниження їх ентеротоксичної дії шляхом моделювання вмісту гідроген сульфід.

**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  $H_2S$  у плазмі крові щурів за умов адреналін-індукованого (АІС) та водно-імобілізаційного стресу (ВІС).

2. З'ясувати зміни NO-синтазної системи, активність мієлопероксидази, ензимів антиоксидантного захисту, оксидативних процесів у СОТнК і концентрацію  $H_2S$  у плазмі крові за умов впливу різних за механізмом дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ.

3. Вивчити особливості морфологічних змін і 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 і стресу.

4. Визначити морфологічні зміни та параметри NO-синтазної системи, ступінь вільнорадикальних процесів, 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 щурів за умов НПЗП-індукованих уражень та дії стресу.

*Об'єкт дослідження* – стан системи NO-синтаза/аргіназа та моделювання вмісту гідрогену сульфід в 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 і 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'єра, 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 iNOS, МПО, процесів ліпопероксидації, вмісту нітритів і нітратів, при одночасному зменшенні активності cNOS та аргінази у СОТнК і вмісту L-аргініну та H<sub>2</sub>S 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+H<sub>2</sub>S, АТВ-346) зменшувалися деструктивні ушкодження, знижувалися активність iNOS, МПО, вміст ТБК-активних продуктів, нітрит аніону в СОТнК та підвищувалася концентрація H<sub>2</sub>S у плазмі крові порівняно з впливом напроксену, що свідчить про цитопротекторний вплив H<sub>2</sub>S. 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 H<sub>2</sub>S у плазмі крові. Вперше доведено, що сполука Les-5054 викликала підвищення концентрації H<sub>2</sub>S у плазмі крові й активність ензимів антиоксидантної системи (СОД, каталази), що свідчить про знижений ентоеротоксичний 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, кафедри 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. Складярова 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. Ященко 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 8<sup>th</sup> 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 100<sup>th</sup> 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 1<sup>st</sup> Symposium 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 і 44 рисунків.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження проведено на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–230 г, яких утримували у стандартних умовах віварію ЛНМУ імені Данила Галицького, згідно з міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів і в інших наукових цілях (Страсбург, Франція 1986), «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) та відповідно до положень Комітету з біоетики ЛНМУ імені Данила Галицького (протокол № 3 від 16.03.2015).

Згідно поставлених завдань було проведено дев'ять серій досліджень (табл. 1). Дію стресу відтворювали, застосовуючи дві моделі – водно-імобілізаційний стрес за Takagi et al. (1964) та адреналін-індукований стрес за Н. И. Белостоцким (1988). Моделювання НПЗП-індукованих уражень тонкої кишки проводили за методикою Л. П. Філаретової (2014), яка передбачає введення індометацину (блокатор ЦОГ) підшкірно дозою 35 мг/кг.

## Групи тварин та серії досліджень

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

Для визначення дії різних за механізмом впливу НПЗП були обрані такі сполуки: інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2 (індометацин [Sigma], напроксен [Sigma], АТВ-346 [Antibe Therapeutics Inc.]), інгібітор ЦОГ-2 (целекоксиб [Sigma]) та інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ (сполука 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-тіазол-4-он - 2A5DHT, що виступає структурним аналогом препарату дарбуфелон). Окрім цього, у роботі досліджено дію новосинтезованих сполук – 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]). Усі досліджувані сполуки розчиняли в DMSO, ресуспендували в 1% розчині карбоксиметилцелюлози та вводили натщесерце перорально об'ємом 1 мл.

H<sub>2</sub>S-вмісний напроксен (АТВ-346) люб'язно надав проф. J. Wallace (кафедра фізіології та фармакології університету Калгарі, Канада); похідні 4-тіазолідинону та 2A5DHT надав для дослідження проф. Р. Б. Лесик (кафедра фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького).

Декапітацію тварин проводили після уретанового знечулення (30 мг/кг внутрішньоочеревинно). Тваринам розтинали передню черевну стінку живота, відбирали тонку кишку, розрізали вздовж, промивали фізіологічним розчином і відсепаровували слизову за допомогою скальпеля. Потім СОТнК гомогенізували в охолодженому 0,9% розчині натрію хлориду у співвідношенні 1:5 при швидкості обертів гомогенізатора 3000 об/хв. Плазму крові отримували шляхом центрифугування при 3000 об/хв. У гомогенатах СОТнК проводили визначення активності NOS (КФ 1.14.13.39) за вмістом L-цитруліну (Раваєва М. Ю., 2011), активність аргінази (КФ 3.5.3.1) оцінювали за змінами концентрації сечовини (Geyer J. W., 1971), вміст NO<sup>2-</sup> та NO<sup>3-</sup> визначали з використанням реактиву Гріса (Green L. S., 1982). Активність мієлопероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали за реакцією з o-діанізидином (Bradley P. P., 1982). Для оцінки прооксидантно-антиоксидантної системи визначали концентрацію ТБК-активних продуктів за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Тимурбулатов М. А., 1981), активність супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15.1.1) за реакцією з нітросинім тетразолієм (Чевари С., 1991), каталази (КФ 1.11.1.6) за реакцією перекису водню з молібдатом амонію (Королук М. А., 1988). Одночасно в плазмі крові визначали концентрацію H<sub>2</sub>S за реакцією з N,N-диметил-p-фенілендіаміном (Ольховський О. С., 2013) і вміст L-аргініну за реакцією Сакагучі (Голиков П. П., 1999).

Для оцінки морфологічних змін фрагменти порожнього та клубового відділів тонкої кишки фіксували в 10% розчині формаліну, після чого їх заливали парафіном. Препарати зрізів СОТнК фарбували гематоксиліном та еозином. Дослідження гістологічних зрізів проводили за допомогою мікроскопа Olympus BX 41 при збільшенні x 200. Морфометричний аналіз висоти й ширини ворсинок проводили за допомогою програми UTHSCSA Image Tool.

Для мікробіологічних досліджень використовували класичний культуральний метод (Климнюк С. І., 2004), при цьому визначали кількісні зміни мікроорганізмів у проксимальному та дистальному відділах тонкої кишки.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програмного пакета Microsoft Excel. Взаємозв'язки досліджуваних показників оцінювали з



використанням коефіцієнта кореляції Спірмена ( $r$ ). Вірогідність різниць між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних оцінювали за допомогою тесту  $t$ -Стюдента. Достовірною вважалась різниця за умов  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

**Вплив інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на морфологічний стан, співвідношення NO-синтазного/аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну та процеси ліпопероксидації у СОТнК.** За умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином відзначали десквамацію епітелію, на деяких ворсинках були присутні конгломерати клітинного детриту, строма ворсинок інфільтрована лейкоцитами (рис. 1, В). Самостійна дія інгібітора ЦОГ-2 викликала збільшення висоти ворсинок (з  $373,1 \pm 5,6$  мкм до  $410,2 \pm 4,2$  мкм;  $p < 0,01$ ), тоді як блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ призводило до зменшення висоти ворсинок ( $p < 0,01$ ) у порожньому відділі тонкої кишки (рис. 1, С, D).

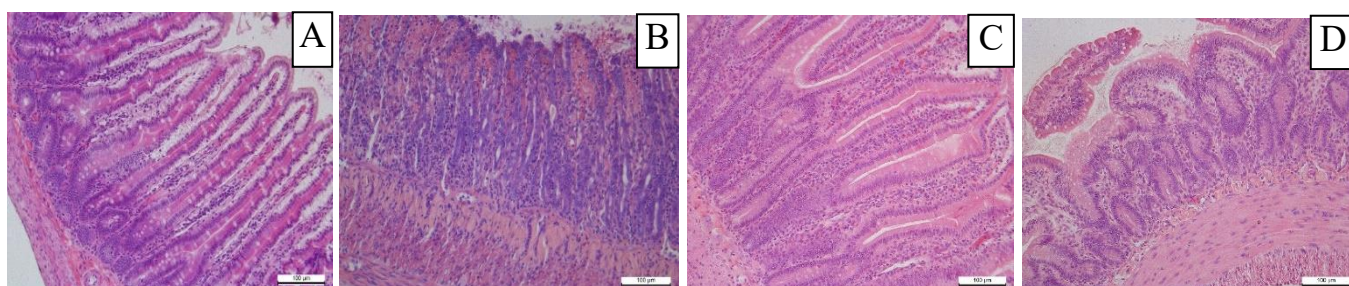


Рис. 1. Гістологічні зрізи СОТнК за умов блокування ЦОГ/ЛОГ: А – контроль; В – інгібітор ЦОГ-1/ЦОГ-2; С – інгібітор ЦОГ-2; D – інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ. Гематоксилін та еозин  $\times 200$ .

Показано, що інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином призводило до підвищення активності iNOS (з  $66,1 \pm 24,9$  до  $125,5 \pm 14,5$  нмоль/хв $\times$ мг;  $p < 0,05$ ), зниження активності аргінази майже втричі (з  $0,2 \pm 0,03$  до  $0,07 \pm 0,01$  мкмоль/хв $\times$ мг;  $p < 0,01$ ) в СОТнК порівняно з показниками контролю. Паралельно збільшувався вміст нітрит-аніона в СОТнК (з  $1,2 \pm 0,1$  до  $2,2 \pm 0,1$  мкмоль/г;  $p < 0,01$ ) та знижувалась концентрація  $H_2S$  у плазмі крові (на 44 %;  $p < 0,01$ ).

При застосуванні целекоксибу та сполуки 2A5DHT також фіксували зростання вмісту  $NO_2^-$  у 1,8 разу ( $p < 0,01$ ) й 1,7 разу ( $p < 0,01$ ) відповідно, та зниження концентрації  $H_2S$  ( $p < 0,01$ ) у плазмі крові за умов дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ.

Концентрація ТБК-активних продуктів у СОТнК зростала за умов самостійної дії блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 (з  $186,6 \pm 8,1$  до  $219,1 \pm 14,2$  мкмоль/г;  $p < 0,05$ ) та ЦОГ-2 (з  $186,6 \pm 8,1$  до  $222,9 \pm 13,2$  мкмоль/г;  $p < 0,05$ ), що свідчить про інтенсифікацію процесів ліпопероксидації. Також відбувалося збільшення активності МПО за умов блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 (з  $0,06 \pm 0,01$  до  $0,1 \pm 0,01$  МО/мг;  $p < 0,05$ ), дії інгібітора ЦОГ-2 (з  $0,06 \pm 0,01$  до  $0,11 \pm 0,02$  МО/мг;  $p < 0,05$ ) та на 50 % ( $p < 0,05$ ) при інгібуванні ЦОГ-2/5-ЛОГ.

Отже, серед досліджуваних інгібіторів ЦОГ/ЛОГ індометацин чинив ульцерогенний вплив, що супроводжувалося розвитком структурно-геморагічних

ушкоджень у дистальному відділі тонкої кишки. Введення різних за механізмом дії НПЗП зумовлювало зміни активності NO-синтази, аргінази, вмісту газових медіаторів та процесів ліпопероксидації, що може спричинити розвиток запальних процесів у СOTнК.

**Дослідження морфологічних змін СOTнК, біохімічних параметрів NO-синтазної системи, про-/антиоксидантного балансу при дії різних за механізмом впливу НПЗП на тлі стресу.** При дії ВІС упродовж 5 год відзначали виражені морфологічні зміни слизової порожньої кишки, що характеризувались порушенням цілісності слизового бар'єра, десквамацією епітелію та інфільтрацією стріми ворсинок лейкоцитами (рис. 2, А). Гістологічними дослідженнями встановлено, що тільки інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином, як за умов самостійної дії, так і на тлі стресу, призводило до розвитку деструктивних ушкоджень у дистальному відділі СOTнК, тоді як введення целекоксибу та сполуки 2A5DHT викликало потовщення епітелію за рахунок збільшення продуктів секреторної діяльності келихоподібних клітин (рис. 2, С, D).

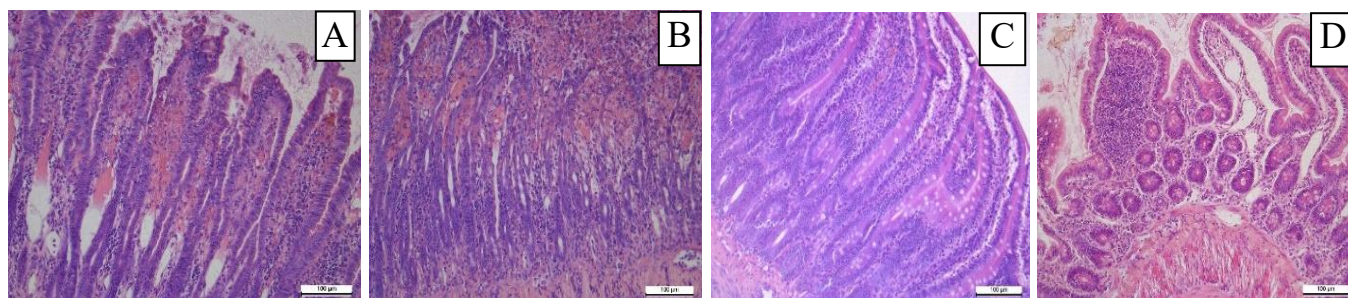


Рис. 2. Гістологічні зрізи СOTнК за умов поєднаного впливу ВІС та НПЗП різного механізму дії: А – ВІС; В – поєднаний вплив інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ВІС; С – інгібітор ЦОГ-2 + ВІС; D –інгібітор ЦОГ-2/5-ЛОГ + ВІС. Гематоксилін і еозин x 200.

За допомогою морфометричного аналізу виявлено зменшення висоти ворсинок у порожньому відділі за умов поєднаної дії стресу та блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 з  $404,5 \pm 7,0$  до  $372,3 \pm 12,8$  мкм ( $p < 0,05$ ) та блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ ( $p < 0,05$ ), порівняно з показниками стресу.

Дія ВІС спричинила різке зростання активності iNOS у 2,8 разу ( $p < 0,01$ ) і вмісту нітрит-аніона у 2,2 разу ( $p < 0,01$ ), зниження активності cNOS – на 57 % ( $p < 0,01$ ), аргінази – на 65 % ( $p < 0,01$ ) у СOTнК та зменшення вмісту L-аргініну в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ),  $H_2S$  – на 30 % ( $p < 0,01$ ) у плазмі крові.

Інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT на тлі дії ВІС, на відміну від впливу інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2, призводило до зниження активності iNOS на 23 % ( $p < 0,05$ ), підвищення активності cNOS на 46 % ( $p < 0,05$ ) та аргінази в 2,1 разу ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками при дії ВІС. Введення індометацину та целекоксибу за умов стресу збільшувало концентрацію L-аргініну на 57 % ( $p < 0,05$ ) та 53 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, порівняно з показниками самостійного ВІС, тоді як блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу призводило до зростання рівня L-аргініну більш, ніж удвічі ( $p < 0,01$ ). Паралельно зі змінами активності iNOS за умов блокування ЦОГ-2 целекоксибом на тлі стресу фіксували зниження суми  $NO_2^- + NO_3^-$  на 35 % ( $p < 0,05$ ) і на

42 % ( $p < 0,05$ ) при дії сполуки 2A5DHT порівняно з показниками самостійного впливу ВІС (табл. 2).

Таблиця 2

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

Група тварин	iNOS, нмоль/хв×мг	cNOS, нмоль/хв×мг	Аргіназа, мкмоль/хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мкмоль/г	H <sub>2</sub> S, мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6	1,2±0,1	88,4±2,7
ВІС 5 год	188,9±9,8**	312,5±32,3**	0,07±0,01**	17,2±1,9**	2,6±0,5**	61,9±6,7**
ВІС + Індометацин	170,9±14,3	349,9±34,0	0,1±0,03	27,0±3,4 <sup>#</sup>	2,4±0,2	59,6±5,8
ВІС + Целекоксиб	149,8±15,8 <sup>#</sup>	373,8±36,6	0,11±0,03	26,3±2,4 <sup>#</sup>	2,1±0,1	64,7±7,7
ВІС + 2A5DHT	144,7±20,7 <sup>#</sup>	455,1±60,0 <sup>#</sup>	0,15±0,02 <sup>##</sup>	37,9±3,9 <sup>##</sup>	2,0±0,1	71,2±6,5

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

Застосування інгібіторів різного механізму дії на тлі ВІС призводило до зниження вмісту ТБК-активних продуктів ( $p < 0,05$ ) та активності МПО ( $p < 0,01$ ), при цьому одночасно зростала активність СОД на 36 % ( $p < 0,05-0,01$ ) порівняно з показниками стресу.

Отже, дія різних за механізмом впливу НПЗП на тлі стресу характеризується гальмуванням активності iNOS, зниженням вмісту нітрит-аніона, ТБК-активних продуктів, активності МПО та підвищенням активності СОД у СОТнК, при дії сполуки 2A5DHT у плазмі крові зростала концентрація L-аргініну та H<sub>2</sub>S.

**Вплив інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 та його H<sub>2</sub>S-вивільняючого аналога (сполуки АТВ-346) за умов стресу на морфологічний стан, NO-синтазну систему, активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК та зміни вмісту H<sub>2</sub>S, L-аргініну в плазмі крові.** Оскільки застосування НПЗП викликає ерозивно-виразкові ушкодження у слизових оболонках органів травлення, важливим є пошук шляхів зниження їх ульцерогенної дії. Одним із таких варіантів є модифікація існуючої молекули НПЗП включенням до її структури H<sub>2</sub>S. У наших дослідженнях був застосований препарат АТВ-346 (напроксен+ H<sub>2</sub>S).

Введення напроксену на тлі стресу не призводило до розвитку видимих деструктивних змін СОТнК, проте при гістологічному аналізі відзначали лейкоцитарну інфільтрацію строми ворсинок та виражені дисциркуляторні зміни судинного русла слизового прошарку (рис. 3, С). Водночас при введенні H<sub>2</sub>S-вивільняючого напроксену (сполуки АТВ-346) на тлі стресу збільшувалася кількість келихоподібних клітин і як наслідок – гіперсекреція слизу (рис. 3, D).

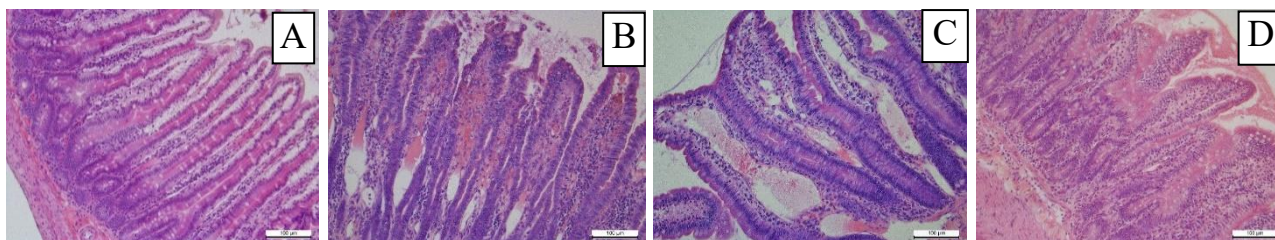


Рис. 3. Гістологічні зрізи СОТнК за умов поєданого впливу ВІС та НПЗП різного механізму дії: А – контрольні тварини; В – ВІС; С – напроксен + ВІС; D – АТВ-346 + ВІС. Гематоксилін та еозин x 200.

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксом на тлі ВІС спричиняло зниження активності iNOS (на 18 %;  $p < 0,05$ ) та зростання вмісту L-аргініну в плазмі крові (в 1,7 разу;  $p < 0,01$ ) порівняно з впливом ВІС. Дія АТВ-346 знижувала активність iNOS на 21 % ( $p < 0,05$ ), підвищувала активність аргінази на 57 % ( $p < 0,01$ ) в СОТнК і концентрацію L-аргініну в плазмі крові в 1,7 разу ( $p < 0,01$ ).

Дія напроксену за умов стресу призводила до зниження вмісту  $H_2S$  порівняно з показниками контролю. Введення АТВ-346 за умов ВІС викликало достовірне підвищення рівня  $H_2S$  у крові на 56 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками ВІС і на 44 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками поєднаної дії напроксену та ВІС (табл. 3).

Таблиця 3

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

Група тварин	iNOS, нмоль/хв $\times$ мг	cNOS, (нмоль/хв $\times$ мг)	Аргіназа, мкмоль/хв $\times$ мг	L-аргінін, мкмоль/л	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мкмоль/г	H <sub>2</sub> S, мкмоль/л
Контроль	66,1 $\pm$ 24,9	728,6 $\pm$ 66,1	0,2 $\pm$ 0,03	46,7 $\pm$ 3,6	1,2 $\pm$ 0,1	88,4 $\pm$ 2,7
ВІС 5 год	188,9 $\pm$ 9,8**	312,5 $\pm$ 32,3**	0,07 $\pm$ 0,01**	17,2 $\pm$ 1,9**	2,6 $\pm$ 0,5**	61,9 $\pm$ 6,7**
ВІС + Напроксен	153,9 $\pm$ 11,3 <sup>#</sup>	327,5 $\pm$ 27,8**	0,09 $\pm$ 0,01	30,1 $\pm$ 3,8 <sup>##</sup>	2,2 $\pm$ 0,3	66,7 $\pm$ 3,5**
ВІС + АТВ-346	148,8 $\pm$ 16,3 <sup>#</sup>	364,3 $\pm$ 34,9**	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>##</sup>	36,9 $\pm$ 2,4 <sup>##</sup>	1,9 $\pm$ 0,3	96,7 $\pm$ 3,0 <sup>##^</sup>

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

Дія обох інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 (напроксену та АТВ-346) за умов стресу знижувала вміст ТБК-активних продуктів та підвищувала активність ензимів антиоксидантного захисту в СОТнК порівняно з показниками ВІС. Проте введення  $H_2S$ -напроксену значно знижувало активність МПО – майже вдвічі ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками ВІС та в 1,6 разу ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками при поєднаній дії ВІС та напроксену. Виявлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем  $H_2S$  та активністю МПО ( $r=0,469$ ;  $p < 0,05$ ) за умов введення АТВ-346 на тлі ВІС (табл. 4).

Дія стресу призводила до кількісних і видових змін складу мікрофлори, що може відігравати важливу роль у розвитку деструктивних ушкоджень. У клубовому відділі тонкої кишки за умов дії 5-годинного ВІС зростала кількість *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 *Clostridium spp.* – з  $(6,3\pm 0,20)\cdot 10^3$  до  $(1,0\pm 0,24)\cdot 10^4$  КУО/г ( $p<0,05$ ).

Таблиця 4

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

Група тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	СОД, МО/мг	Каталаза, мкмоль/хв $\times$ мг	МПО, МО/мг
Контроль	186,6 $\pm$ 8,1	23,9 $\pm$ 1,0	16,9 $\pm$ 1,6	0,06 $\pm$ 0,01
ВІС 5 год	261,0 $\pm$ 16,0**	20,2 $\pm$ 1,8*	15,7 $\pm$ 2,9	0,30 $\pm$ 0,03**
ВІС + Напроксен	221,0 $\pm$ 7,8 <sup>#</sup>	22,9 $\pm$ 2,8	20,8 $\pm$ 0,9 <sup>#</sup>	0,27 $\pm$ 0,05**
ВІС+АТВ-346	217,0 $\pm$ 7,2 <sup>#</sup>	25,0 $\pm$ 1,3 <sup>#</sup>	19,5 $\pm$ 0,6 <sup>#</sup>	0,16 $\pm$ 0,03 <sup>##^</sup>

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

Дія напроксену на тлі стресу викликала збільшення кластридіальної мікрофлори в дванадцятипалій кишці з  $(6,3\pm 0,16)\cdot 10^2$  до  $(1,0\pm 0,22)\cdot 10^3$  КУО/г ( $p<0,05$ ), а також тенденцію до збільшення кількості ентерококів в проксимальному та дистальному відділах тонкої кишки порівняно з показниками ВІС. Отже,  $H_2S$ -вивільнюючий напроксен на тлі стресу чинить значно меншу ульцерогенну дію.

**Вплив похідних 4-тіазолідинону на процеси цитопротекції у СОТнК за умов стресу та НПЗП-індукованих уражень.** Одним із нових напрямів є вивчення протизапальної дії сірковмісних похідних 4-тіазолідинону. Дія похідних 4-тіазолідинону за умов стресу не викликала макроскопічних змін СОТнК, гістологічно – збільшувалась кількість келихоподібних клітин і слизу (рис. 4).

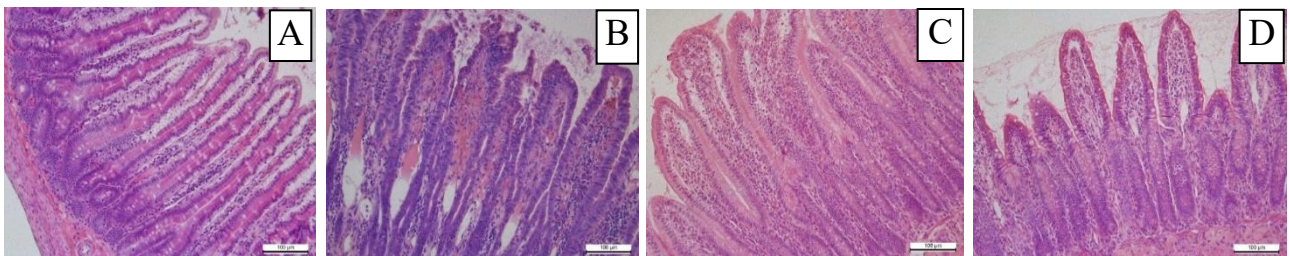


Рис. 4. Гістологічні зміни слизової оболонки порожньої кишки за умов блокування ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі стресу; гематоксилін та еозин  $\times 200$ . А – Контрольні тварини; В – ВІС; С – Les-5055 за умов ВІС; D – Les-5054 на тлі ВІС.

Введення сполуки Les-5055 за умов стресу призводило до підвищення активності cNOS на 42 % ( $p<0,01$ ) у СОТнК та вмісту L-аргініну в 2,5 разу ( $p<0,01$ ) у плазмі крові порівняно з дією ВІС. Відзначали тенденцію до зниження активності iNOS та підвищення активності аргінази ( $p>0,05$ ) порівняно з показниками стресу. Дія сполуки Les-5054 на тлі ВІС вираженіше змінює стан NOS/аргіназної системи – активність cNOS підвищувалася на 48 % ( $p<0,01$ ), аргінази – удвічі ( $p<0,01$ ), та вміст

стабільних метаболітів NO ( $p < 0,05$ ), активність iNOS знижувалась на 21 % ( $p < 0,01$ ) у СОТнК порівняно з самотійною дією ВІС; вміст L-аргініну в плазмі крові зростав у 2,5 разу ( $p < 0,01$ ). Введення досліджуваних сполук за умов ВІС сприяло відновленню рівня  $H_2S$  в плазмі крові до показників контрольної групи (табл. 5).

Таблиця 5

**Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та концентрацію L-аргініну,  $H_2S$  в плазмі крові за умов стресу ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )**

Група тварин	iNOS, нмоль/ хв×мг	cNOS, нмоль/ хв×мг	Аргіназа, мкмоль/ хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л	$NO_2^-$ , мкмоль/г	$H_2S$ , мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6	1,2±0,1	88,4±2,7
ВІС 5 год	188,9±9,8**	312,5±32,3**	0,07±0,01**	17,2±1,9**	2,6±0,5**	61,9±6,7**
ВІС + Les-5055	153,5±32,0	445,3±24,8##	0,09±0,01	43,2±1,4##	2,0±0,2	84,1±1,9##
ВІС + Les-5054	148,9±6,7##	462,6±30,4##	0,14±0,005##	43,9±6,9##	1,9±0,05#	95,5±2,9##

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

Важливо, що за умов застосування сполуки Les-5054 на тлі стресу зменшувався вміст ТБК-активних продуктів на 22 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками стресу. Відзначено також обернений кореляційний зв'язок між змінами ТБК-активних продуктів і концентрацією  $H_2S$  ( $r = -0,437$ ;  $p < 0,05$ ).

Активність СОД зростала на 29 % ( $p < 0,05$ ) за умов поєднаної дії стресу та сполуки Les-5055 і на 48 % ( $p < 0,01$ ) – за дії сполуки Les-5054 на тлі стресу порівняно з показниками ВІС. Похідні 4-тіазолідинону знижували активність МПО на 30 % ( $p < 0,05$ ) у разі введення сполуки Les-5055 на тлі ВІС та в 2,5 разу ( $p < 0,01$ ) за умов поєднаної дії сполуки Les-5054 й ВІС порівняно з показниками стресу (табл. 6).

Таблиця 6

**Активність ензимів антиоксидантного захисту, МПО та концентрація ТБК-активних продуктів за умов дії похідних 4-тіазолідинону на тлі ВІС в 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
ВІС 5 год	268,4±30,7**	20,2±1,8*	15,7±2,9	0,30±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: # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,01$ .

Зміни параметрів системи NO-синтаза/аргіназа, процесів ліпопероксидації свідчать про зниження ентеротоксичного впливу ВІС за умов введення похідних 4-тіазолідинону як потенційних донорів  $H_2S$ . Проте, порівнюючи дію обох сполук, більш виражений цитопротекторний ефект був виявлений за умов введення сполуки Les-5054.

Отримані результати свідчать, що серед досліджуваних НПЗП найбільший ентеротоксичний вплив чинив індометацин. У наступних серіях досліджень вивчали коригувальний вплив похідних 4-тіазолідинону на тлі індометацин-індукованих уражень.

Підшкірне введення індометацину у дозі 35 мг/кг через 72 год викликало розвиток структурно-геморагічних ушкоджень в СОТнК, що локалізувались у клубовому відділі кишки. Триразове введення похідних 4-тіазолідинону дозою 10 мг/кг на тлі НПЗП-індукованих уражень сприяло зменшенню площі деструктивних ушкоджень у 1,6 разу ( $p < 0,01$ ) за умов дії сполуки Les-5055 (рис. 5, С) та в 2,7 разу ( $p < 0,01$ ) при введенні Les-5054 (рис. 5, D).

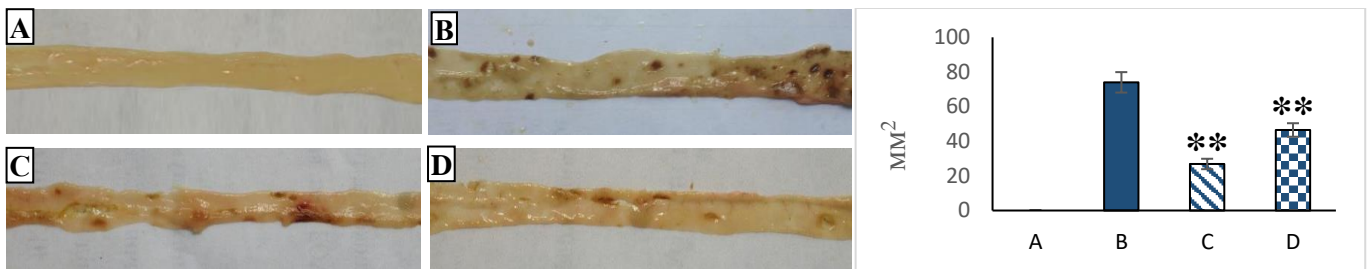


Рис. 5. Макроскопічний стан і площа структурно-геморагічних ушкоджень СОТнК за умов впливу похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень; А – Контрольні тварини; В – індометацин-індуковані ураження; С – Les-5055 на тлі НПЗП-індукованих уражень; D – Les-5054 на тлі НПЗП-індукованих уражень; \*\* –  $p < 0,01$  порівняно з показниками самостійної дії індометацину.

Інгібування ЦОГ-1/ЦОГ-2 індометацином призводило до активації окисного шляху метаболізму L-аргініну, при цьому активність iNOS підвищувалась втричі ( $p < 0,01$ ) та одночасно знижувалась активність sNOS (більш ніж удвічі;  $p < 0,01$ ) й аргінази (в 4 рази;  $p < 0,01$ ) у СОТнК порівняно з показниками контролю (табл. 7).

За умов введення сполуки Les-5055 на тлі індометацину зафіксовано підвищення активності аргінази у 1,8 разу ( $p < 0,05$ ) у СОТнК та концентрації L-аргініну в плазмі крові на 30 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками самостійної дії індометацину. За умов застосування сполуки Les-5054 на тлі індометацин-індукованих уражень знижувалася активність iNOS на 35 % ( $p < 0,01$ ), паралельно підвищувалася активність sNOS та аргінази на 52 % ( $p < 0,01$ ) й утричі ( $p < 0,01$ ) відповідно.

Неселективне блокування ЦОГ індометацином призводило до зниження вмісту  $H_2S$  у плазмі крові ( $p < 0,05$ ), при цьому застосування похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень як потенційних донорів  $H_2S$ , сприяло відновленню вмісту газового медіатора в плазмі крові, що навіть перевищували показники тварин контрольної групи.

Таблиця 7

**Вплив похідних 4-тіазолідинону на стан системи NO-синтаза/аргіназа в СОТнК та концентрацію L-аргініну, H<sub>2</sub>S у плазмі крові за умов НПЗП-індукованих уражень (M±m, n=8)**

Група тварин	iNOS, нмоль/ хв×мг	cNOS, нмоль/ хв×мг	Аргіназа, мкмоль/ хв×мг	L-аргінін, мкмоль/л	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мкмоль/г	H <sub>2</sub> S, мкмоль/л
Контроль	66,1±24,9	728,6±66,1	0,2±0,03	46,7±3,6	1,2±0,1	88,4±2,7
Індометацин	203,6±26,8**	331,9±62,5**	0,05±0,02**	31,2±2,8**	2,8±0,2**	79,5±1,0*
Les-5055 + Індометацин	162,3±27,7	415,9±44,0	0,09±0,006 <sup>#</sup>	40,7±4,2 <sup>#</sup>	1,9±0,1 <sup>##</sup>	93,0±2,5 <sup>#</sup>
Les-5054 + Індометацин	132,9±27,5 <sup>#</sup>	506,3±45,3 <sup>##</sup>	0,15±0,04 <sup>##</sup>	42,6±4,1 <sup>#</sup>	1,8±0,2 <sup>##</sup>	98,5±2,6 <sup>##</sup>

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: \*\* – p<0,01; відносно показників самостійної дії індометацину: <sup>#</sup> – p<0,05, <sup>##</sup> – p<0,01.

Моделювання НПЗП-індукованих уражень СОТнК супроводжувалось активацією прооксидантних процесів, про що свідчить зростання концентрації ТБК-активних продуктів (на 56 %; p<0,01) й активності МПО (в 4 рази; p<0,01) у СОТнК (табл. 8). Також відзначалось компенсаторне зростання активності антиоксидантних ензимів. Введення похідних 4-тіазолідинону сприяло зниженню концентрації ТБК-активних продуктів, при цьому зниження активності МПО більш ніж удвічі (p<0,01) спостерігали тільки за умов поєднаної дії сполуки Les-5054 та індометацину.

Таблиця 8

**Активність ензимів антиоксидантного захисту, МПО та концентрація ТБК-активних продуктів за умов дії похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень 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
Індометацин	291,4±26,7**	27,8±1,3*	22,4±2,6*	0,25±0,02**
Les-5055 + Індометацин	242,6±16,0 <sup>#</sup>	27,9±1,5	20,0±2,4	0,21±0,06
Les-5054 + Індометацин	199,1±11,1 <sup>##</sup>	24,9±0,9 <sup>#</sup>	20,9±1,2	0,08±0,02 <sup>##</sup>

Примітка. Достовірність змін відносно показників контрольної групи: \*\* – p<0,01; відносно показників самостійної дії індометацину: <sup>#</sup> – p<0,05, <sup>##</sup> – p<0,01.

Отже, за умов введення новосинтезованих похідних 4-тіазолідинону на тлі НПЗП-індукованих уражень СОТнК зменшувався ульцерогенний вплив індометацину, що супроводжувалося зниженням активності iNOS, прооксидантної



системи в СОТнК і підвищенням вмісту гідрогену сульфїду в плазмі крові, що може відігравати одну з ключових ролей у зниженні ентеротоксичної дії індометацину.

## 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-тіазолїдинону, виявлено механізми цитопротекції у слизовій оболонці тонкої кишки та доведено зниження ентеротоксичності шляхом моделювання вмісту гідрогену сульфїду.

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 у тричі 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 аргїнази. Вміст L-аргїніну 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-аргїніну ( $p < 0,05$ ) 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+ $H_2S$ ) 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  $H_2S$  (на 56 %;  $p < 0,01$ ) у плазмі крові порівняно з показниками ВІС, що свідчить про цитопротекторний вплив вивільненого  $H_2S$ .

5. Введення похідних 4-тіазолїдинону 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 ( $p < 0,01$ ),  $H_2S$  ( $p < 0,01$ ) 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ 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  $H_2S$ -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., Шичула 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. **Ільків І. 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  $H_2S$ -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. **Ільків 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., **Ільків 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 8<sup>th</sup> 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. **Ільків І. 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 11<sup>th</sup> 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. **Пків І.**, Lesyk R., Sklyarov O. Novel 4-thiazolidinone derivatives as cytoprotective agents against NSAID-induced injury. 24<sup>th</sup> 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. **Пків І.**, Lesyk R., Sklyarov O. Effect of novel 4-thiazolidinone derivatives during COXs inhibition in small intestine of rats. 8<sup>th</sup> 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).

## АНОТАЦІЯ

**Лозинська І.І. Роль системи NO-синтаза/аргіназа за умов блокування циклооксигенази та моделювання вмісту гідрогену сульфїду при стресі у слизовій оболонці тонкої кишки.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2018.

Дисертаційна робота присвячена вивченню дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ за умов стресу різного генезу на морфологічний стан тонкої кишки, параметри системи NO-синтаза/аргіназа, про-/антиоксидантну рівновагу в слизовій оболонці тонкої кишки та зниження їх цитотоксичного впливу шляхом модулювання рівня гідроген сульфїду.

Встановлено виражений цитотоксичний вплив інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 – індометацину на СОТнК, одноразове введення якого супроводжувалось деструктивними ушкодженнями в дистальному відділі тонкої кишки як за умов самостійної дії, так і на тлі стресу. Встановлено, що за умов поєднаної дії стресу та НПЗП відбувається активація процесів перекисного окиснення ліпідів та зниження активності ензимів антиоксидантного захисту, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Доведено, що введення похідних 4-тіазолїдинону (сполуки Les-5054) та H<sub>2</sub>S-вивільняючого напроксену (сполука АТВ-346), у якості донорів H<sub>2</sub>S, чинять коригувальний вплив щодо нітрузо-оксидативних процесів та про-/антиоксидантної системи як на тлі стресу, так і при НПЗП-індукованих ураженнях тонкої кишки.

**Ключові слова:** слизова оболонка тонкої кишки, нітроген оксид, гідроген сульфід, нестероїдні протизапальні препарати, похідні 4-тіазолідинону.

## АННОТАЦІЯ

**Лозинская И.И. Роль системы NO-синтаза/аргиназа при блокировании циклооксигеназы и моделирование содержания сероводорода при стрессе в слизистой оболочке тонкой кишки.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2018.

Диссертация посвящена изучению воздействия ингибиторов ЦОГ/ЛОГ при стрессе различного генеза на морфологическое состояние тонкой кишки, параметры системы NO-синтаза/аргиназа, про-/антиоксидантный баланс в слизистой оболочке тонкой кишки и снижение их цитотоксического воздействия путем моделирования уровня сероводорода.

Установлено выраженное цитотоксическое воздействие ингибитора ЦОГ-1/ЦОГ-2 – индометацина на СОТнК, однократное введение которого сопровождалось деструктивными повреждениями в дистальном отделе тонкой кишки как в условиях самостоятельного действия, так и на фоне стресса. Установлено, что в условиях комбинированного влияния стресса и НПВП происходит активация процессов перекисного окисления липидов и снижение активности ферментов антиоксидантной защиты, что свидетельствует о развитии оксидативного стресса. Доказано, что введение производных 4-тиазолидинона (соединения Les-5054) и соединения АТВ-346 как доноров  $H_2S$ , оказывает корректирующее влияние относительно нитрозо-оксидативных процессов и про-/антиоксидантной системы как на фоне стресса, так и при НПВП-индуцированных поражениях тонкой кишки.

**Ключевые слова:** слизистая оболочка тонкой кишки, оксид азота, сероводород, нестероидные противовоспалительные препараты, производные 4-тиазолидинона.

## ANNOTATION

**Lozynska I.I. Role of NO-synthase/arginase system on the background of cyclooxygenase inhibition and modeling of hydrogen sulfide content under stress conditions in small intestinal mucosa.** – Manuscript.

The thesis for a candidate of biological sciences degree in speciality 03.00.04 – biochemistry. – Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, 2018.

The dissertation is devoted to the evaluation on the mechanisms of action of COX/LOX inhibitors on the morphological state of the small intestine, parameters of the NO-synthase/arginase system, pro-/antioxidant equilibrium in various models of stress in the small intestinal mucosa (SIM) and reduction of their cytotoxic action by modeling of hydrogen sulfide content.

It has been found that the administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with different mechanism of action on the background of water-restraint stress

(WRS) during 5 h leads to a disruption of the metabolism of gaseous mediators (NO and H<sub>2</sub>S) and the development of prooxidant processes in SIM. The most pronounced cytotoxic effect was observed under condition of the nonselective COX-1/COX-2 inhibitor administration - indomethacin, which caused the development of destructive injuries in the distal part of the small intestine on the background of the independent administration and in conjunction with stress. Administration of the COX-2/5-LOX inhibitor compound 2A5DHT in WRS reduced the activity of iNOS (for 23 %,  $p < 0.05$ ), and increased cNOS (for 46 %,  $p < 0.05$ ) and arginase activity (2.1-fold,  $p < 0.01$ ) in SIM, which indicates the role of the lipoxygenase pathway of the arachidonic acid metabolism in the regulation of the NO-synthase system.

Comparing the effect of naproxen and its H<sub>2</sub>S-releasing compound – ATB-346, it should be noted that significant changes in the basic parameters of the NOS/L-Arg/NO system on the background of WRS were not detected and indicate the dominant effect of the base NSAID substance. However, the most pronounced effect of ATB-346 was observed on the activity of MPO, that decreases both in WRS and epinephrine-induced stress conditions (2-fold and 1.7-fold,  $p < 0.01$ , respectively), revealing the biochemical mechanisms of the relationship between H<sub>2</sub>S and MPO.

The administration of 4-thiazolidinone derivatives (compounds Les-5054 and Les-5055) on the background of stress, resulted in suppressing the oxidative pathway of L-Arg metabolism, lipoperoxidation processes, and increasing the activity of antioxidant defence enzymes in SIM, indicating a pronounced cytoprotective effect of the investigated compounds.

The ulcerogenic effect of the non-selective COX-1/COX-2 inhibitor indomethacin (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, 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 ( $p < 0.01$ ), arginase activity - 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 triple administration of the 4-thiazolidinone derivatives on the background of indomethacin-induced lesions decreased the total area of destructive lesions in SIM. It was found that administration of H<sub>2</sub>S releasing compound (Les-5054) decreased iNOS activity for 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 indomethacin.

Introduction of 4-thiazolidinone derivatives (particularly compound Les-5054), as H<sub>2</sub>S donors, on the background of stress conditions as well as NSAID-induced lesions of the small intestine exhibit pronounced cytoprotective, anti-inflammatory and antioxidant effects and increase H<sub>2</sub>S concentration, playing a key role in reduction the enterotoxic effect of nonselective COX inhibitors and stress in the small intestine.

**Key words:** small intestinal mucosa, nitric oxide, hydrogen sulfide, nonsteroidal anti-inflammatory drug, 4-thiazolidinone derivatives.

Підписано до друку 12.11.18  
Формат 60x84/16. Папір офсетний.  
Друк на різнографі. Зам. №12/11-2  
Ум. друк. арк. 0,9  
Наклад 100 прим.

Видавництво “Галич-Прес”  
Видавець ФОП Король І.В.  
м. Львів, вул. Гнатюка, 17  
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924  
Свідоцтво ДК №5353 від 24.05.2017 р.