

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

РУМИНСЬКА ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА

УДК 579.262 : (547.789 + 615.276.1) - 092.9

**ПРОТИЗАПАЛЬНІ Й ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНОГО
4-ТІАЗОЛІДИНОНУ ТА НЕСТЕРОЇДНОГО ПРОТИЗАПАЛЬНОГО
ПРЕПАРАТУ ТА ЇХНІЙ ВПЛИВ НА МІКРОЕКОЛОГІЧНИЙ ТА
БІОХІМІЧНИЙ СТАТУС ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН**

091 — Біологія

09 — Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Т.М. Руминська

Наукові керівники: Корнійчук Олена Петрівна, доктор медичних наук
професорка;

Салига Юрій Тарасович, доктор біологічних наук, член-кореспондент НААН

Львів — 2024

АНОТАЦІЯ

Руминська Т.М. Протизапальні й протимікробні властивості похідного 4-тіазолідинону та нестероїдного протизапального препарату та їхній вплив на мікроекологічний та біохімічний статус лабораторних тварин. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (09-Біологія). — Інститут біології тварин НААН, Львів, 2024.

У представленій дисертаційній роботі вперше досліджувалась новосинтезована похідна 4-тіазолідинону (5Z)-5-[(1,3-Дифенілпіразол-4-іл) метилен]тіазолідин-2,4-діон — сполука Les-6490. Досліджено її токсичні, протизапальні та антимікробні властивості, а також проведено порівняльне дослідження впливу сполуки Les-6490 та протизапального препарату — німесуліду на альтерацію кишкового мікробіому та окремих представників кишкової мікробіоти.

Вивчення антибактеріальної та протигрибкової дії сполук проводилось методом дифузії в агар та методом серійних розведень *in vitro*. Експерименти *in vivo* виконували на лабораторних щурах, які були розділені на наступні групи: контрольна група; група з місцевим запальним процесом у тканинах стопи, індукованим ад'ювантом Фрейнда; групи здорових тварин та тварин із запаленням, у яких досліджували дію сполуки Les-6490 та німесуліду.

У роботі застосовано мікробіологічні, гематологічні та біохімічні методи. Проведено аналіз складу бактеріальних геномів кишкового каналу щурів за допомогою секвенування 16s рРНК з наступним генеруванням операційних таксономічних одиниць та ідентифікацією одержаних таксонів різних рівнів — від Filum (тип) до Species (вид).

Отримані результати свідчать про те, що досліджувана речовина може бути віднесена до малотоксичних препаратів, ЛД₅₀ сполуки для мишей становить 910,0 ± 57,0 мг/кг (4 клас токсичності), і є придатною для використання у біологічних експериментах.

Встановлено, що сполука Les-6490 проявила протизапальні властивості, затримуючи розвиток клінічних і біометричних проявів запального процесу у стопі та зменшуючи нейтрофільний лейкоцитоз. При цьому спостерігалися ефекти, що перевищували протизапальний вплив препарату порівняння - німесулід.

У ході експерименту не виявлено впливу сполуки Les-6490 на основні біохімічні показники крові та рівень трансаміназ, що свідчить про відсутність токсичного впливу на функцію печінки в умовах проведення досліджень.

Встановлено, що при запальному процесі на тлі введення досліджуваної сполуки Les-6490 у щурів не виявляються зміни вмісту загального протеїну, концентрації сечовини та креатиніну порівняно з контролем, проте спостерігається зниження вмісту альбуміну. Поза тим препарат порівняння (німесулід) викликав зниження кількісного рівня загального протеїну, альбуміну та сечовини. При дослідженні рівня холестеролу та тригліцеридів виявлено зниження вмісту показників ліпідного обміну у всіх групах тварин у порівнянні з контролем. Особливо виражене зниження цих показників зафіксовано в крові тварин дослідних груп, що одержували сполуку Les-6490 на тлі індукованого запалення. Експериментально підтверджено також зниження кількості неорганічних фосфатів та кальцій-іонів на тлі запального процесу.

Встановлено коригуючий вплив досліджуваних речовин на показники порушень мінерального обміну, проте більш виражений ефект спостерігався при дії на тварин сполуки Les-6490.

За результатами скринінга 22 похідних 4-тіазолідинонів, встановлено, що сполука Les- 6490 проявила найбільш виражені антимікробні властивості. Для вивчення антимікробної дії в якості тест-мікроорганізмів використано музейні штами та клінічні ізоляти грамнегативних бактерій родини *Enterobacteriaceae*: *Proteus vulgaris* №152, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* 189, *Raoultella terrigena* ATCC 33257, а також представник родини *Vibrionaceae*, роду *Aeromonas* — *Aeromonas hydrophila* N196.

Вивчено дію сполуки Les-6490 на грампозитивні мікроорганізми — *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (резистентний до пеніцилінів), *Staphylococcus aureus* N23, *Lactobacillus fermentum* (пробіотичний штам). Протигрибкові ж властивості сполуки Les-6490 досліджено на штаммах одноклітинних грибів *Candida albicans* ATCC 885-653, *Candida albicans* N67, *Saccharomyces cerevisiae* N62.

Виявлено помірну та вибірккову антимікробну дію сполуки Les-6490 на стафілококи, при цьому не спостерігалось впливу на лактобактерії та γ -протеобактерії. Протигрибкова дія проявлялась на рівні мінімальної інгібуючої концентрації контрольного препарату — клотримазолу, а саме до *Saccharomyces cerevisiae* N62.

При дослідженні впливу сполуки Les-6490 на біоплівкові форми клінічних штамів *S. aureus subsp.* та *L. fermentum* статистично значущих змін оптичної щільності не помічено.

Проведене бактеріологічне дослідження показало зміни стану мікробіому кишкового біотопу щурів під впливом досліджуваних речовин. Виявлено зниження кількості протеобактерій та лактобактерій при використанні німесулід, а також збільшення кількості *Bifidobacterium* при використанні сполуки Les-6490, що вказує на потенційну здатність Les-6490 відновлювати баланс кишкової мікробіоти.

При аналізі метагеномних даних кишкового каналу щурів, в групі тварин, котра отримувала сполуку Les-6490, виявлено високий вміст бактерій роду *Helicobacter*. Важливо зазначити, що в групах, які також отримували сполуку Les-6490, не виявлено прокаріотів роду *Treponema*. Це може свідчити про протитрепонемну дію цієї сполуки.

Слід також зауважити, що сполука суттєво вплинула на підвищення рівня протизапальних мікроорганізмів, таких як *Blautia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Succivibrionaceae* та *Coriobacteriales*.

За генотипом у дослідженні ідентифіковано окремі види — *F.prausnitzii*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*. Вказані таксони населяють кишковий канал людини й тварин, проявляють протизапальну дію, продукують такі важливі метаболіти як коротколанцюгові жирні кислоти (бутират), а також їх використовують як пробіотичні препарати.

Метагеномним аналізом із застосуванням статистичних методів мікробіологічної екогеноміки — визначення кривої біорізноманіття, індексів оцінки охоплення на основі чисельності (ACE— Abundance-based coverage estimators), графіків «цілого дерева» — встановлено зростання альфа-різноманіття більш за дії сполуки Les-6490, ніж при застосуванні препарату порівняння німесулідю.

Виявлено наростання бета-різноманіття мікробіомів у групах тварин, що одержували сполуку Les-6490 на основі методів аналізу головних компонентів з кластерним перетворенням, несиметричного багатовимірного шкалювання, процедури перестановки з кількома відповідями.

На основі результатів досліджень із застосуванням t-тестового аналізу таксонів різних рівнів, а також методів метагеноміки, виявлено статистично значущу різницю ($p < 0,05$) вмісту бактерій з протизапальними властивостями родів *Collinsella* та родини *Lachnospiraceae* у групах тварин, що одержували сполуку Les-6490.

При вивченні складу парієтального мікробіому в групах тварин, що одержували сполуку Les-6490 виявлено високий показник операційно таксономічних одиниць, які відповідали геному мікроорганізмів родів *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Helicobacter*, котрі в інших групах відсутні. Однак, на відміну від транзиторних мікробіомів, не спостерігалася присутність біфідобактерій.

Встановлено, що досліджувана сполука призводить до збільшення мікробного різноманіття, що може пояснити її протизапальну дію та позитивний вплив на відновлення мікробіоти кишечника.

Отримані результати вказують на доцільність подальшого дослідження сполуки Les-6490, з метою розширеного вивчення її протизапальних властивостей, впливу на мікрофлору кишкового каналу та можливості використання для корекції змін мікробіому при запальних процесах.

Ключові слова: антимікробна активність, біоплівка, запалення, НП, токсичність, біохімічні параметри, мета-аналіз, мікробіота, 4-тіазолідинони, ліпідний обмін, білковий обмін, лабораторні тварини, мікробіом, секвенування, лейкоцитарний профіль.

ABSTRACT

Rumynska T.M. Anti-inflammatory and antimicrobial properties of a 4-thiazolidinone derivative and a nonsteroidal anti-inflammatory drug and their effect on the microecological and biochemical status of laboratory animals.— Qualifying scientific work with manuscript rights.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, specialty.— 091 Biology (09-Biology). — Institute of Animal Biology of the National Academy of Sciences, Lviv, 2024.

In the presented dissertation, the newly synthesized derivative of 4-thiazolidinone(5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione) – compound Les-6490 – was investigated for the first time.

The aim was to study its toxic, anti-inflammatory and antimicrobial properties, as well as to conduct a comparative study of the effect of the compound Les-6490 and the control anti-inflammatory drug nimesulide on the alteration of the intestinal microbiota and the intestinal microbiome.

The antibacterial and antifungal activity of the compounds was studied *in vitro*. *In vivo* experiments were performed on laboratory rats, which were divided into the following groups: control group; a group with a local inflammatory process in the tissues of the foot, induced by Freund's adjuvant; groups of healthy animals and animals with inflammation in which the effects of the compound Les-6490 and nimesulide were studied.

Microbiological, hematological and biochemical methods are used in the work. To analyze the composition of the bacterial genomes of the microbiota of the intestinal tract of rats, 16s RNA sequencing was used, followed by the generation of operational taxonomic units (OTUs) and the identification of the resulting taxa of different levels — from Filum (type) to Species.

The obtained results indicate that the substance under study belongs to low-toxic agents (4th class of toxicity) and is suitable for use in biological experiments.

The compound Les-6490 showed anti-inflammatory properties, delaying the development of clinical and biometric signs of the inflammatory process in the foot and reducing neutrophilic leukocytosis. At the same time, the observed effects exceeded the anti-inflammatory effect of the control drug nimesulide.

During the experiment, no influence of the compound Les-6490 on the main biochemical parameters of the blood and the level of transaminases was detected, which indicates the absence of a toxic effect of the drug on the liver under the conditions used during the experiment. It was established that during the inflammatory process, there were no changes in the protein content, urea and creatinine concentration in rats compared to the control, however the albumin level decreased.

The study compound Les-6490 did not cause significant changes in blood biochemical parameters, while the comparator caused a decrease in protein, albumin and urea levels. When examining the level of cholesterol and triglycerides, a decrease in the content of indicators of lipid metabolism was found in all groups of animals compared to the control.

These indicators were especially markedly decreased in the group of animals that received the compound Les-6490 against the background of induced inflammation.

The decrease in the amount of inorganic phosphates and calcium ions against the background of the inflammatory process has been experimentally confirmed. The studied substances slightly reduced the indicators of mineral metabolism disorders, but a more pronounced effect was observed when animals were exposed to the compound Les 6490.

When screening 22 derivatives of 4-thiazolidinones, compound Les-6490 showed the most pronounced antimicrobial properties. To study of the antimicrobial activity the following museum strains and clinical isolates of gram-negative bacteria of the *Enterobacteriaceae* family were used as the test microorganisms: *Proteus vulgaris* No. 152, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* 189, *Raoultella terrigena* ATCC 33257, and a representative of the *Vibrionaceae* family,

Aeromonas genus — *Aeromonas hydrophila* N196. The effect of the compound Les-6490 on gram-positive bacteria — *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (resistant to penicillins), *Staphylococcus aureus* N239, *Lactobacillus fermentum* (probiotic strain) was also investigated.

The antifungal effect of the compound Les-6490 was also studied against unicellular fungi: *Candida albicans* ATCC 885-653, *Candida albicans* N679, *Saccharomyces cerevisiae* N62.

A moderate and selective antimicrobial effect of the compound Les-6490 on gram-positive staphylococci was found, while no effect on lactobacilli and γ -proteobacteria was observed.

The antifungal effect was manifested at the level of the minimum inhibitory concentration of the control drug - clotrimazole, namely to *Saccharomyces cerevisiae* N62.

When studying the effect of the compound Les-6490 on biofilm forms of clinical strains of *S. aureus subsp.* and *L. fermentum*, no statistically significant changes in optical density were observed.

The conducted bacteriological investigation showed changes in the state of the microbiome of the rats' intestinal biotope under the influence of the studied substances. A decrease in the number of *Proteobacteria* and *Lactobacilli* when using nimesulide, as well as an increase in the number of *Bifidobacterium* when using the Les-6490 compound, was revealed, indicating the potential ability of Les-6490 to restore the balance of the intestinal microbiota.

OTUs analysis revealed a high content of *Helicobacter* bacteria in the group of animals that received the Les-6490 compound. It is important to note that in groups AL and L, which also received the compound Les-6490, no *Treponema* prokaryotes were detected. This may indicate the anti-treponematous effect of this compound.

It should also be noted that the compound significantly increased the levels of anti-inflammatory microorganisms such as *Blautia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Succivibrionaceae* and *Coriobacteriales*.

Separate species were identified by genotype in the study — *F.prausnitzii*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*. These taxa inhabit the intestinal tract of humans and animals, have an anti-inflammatory effect, produce such important metabolites as the short-chain fatty acids (butyrate), and are also used as probiotic preparations.

Analyzing OTUs with the use of statistical methods of microbiological ecogenomics — determination of the biodiversity curve, abundance-based coverage estimators (ACE), graphs of the “whole tree” — it was established that the growth of alpha diversity of taxa is more pronounced under the influence of the compound Les- 6490 than when using the control drug nimesulide.

Using cluster-transformed principal component analysis, nonsymmetric multivariate scaling, and a multiple response permutation procedure, an increase in microbiome beta diversity was found in groups of animals treated with the compound Les-6490.

Based on the results of research using t-test analysis of taxa of different levels, as well as metagenomics methods, a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the content of bacteria with anti-inflammatory properties of the genus *Collinsella* and the *Lachnospiraceae* family was found in the groups of animals that obtained the compound Les-6490.

When studying the composition of the parietal microbiome in the groups of animals treated with the compound Les-6490, a high number of OTUs was found, which corresponded to the genome of microorganisms of the genera *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, and *Helicobacter*, which were absent in the other groups. However, in contrast to transient microbiomes, the presence of bifidobacteria was not observed.

The investigated compound leads to an increase in microbial diversity, which may explain its anti-inflammatory effect and positive effect on the restoration of intestinal microbiota.

The obtained results indicate the expediency of further investigation of the compound Les-6490 with the aim of an extended study of its anti-inflammatory

properties, the effect on the microflora of the intestinal canal and the possibility of correcting changes in the microbiome during inflammatory processes.

Key words: antimicrobial activity, antibiofilm formation, inflammation, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, toxicity, biochemical parameters, meta-analysis, microbiota, 4-thiazolidinones, lipid metabolism, protein metabolism, laboratory animals, microbiome, sequencing, leukocyte profile.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті

1. Rumynska, T. M., Hural, A. R., Konechnyi, Y. T., Vynnytska, R. B., Lozynskyi, A. V., Salyha, Y. T., Korniychuk, O. P., & R.B. Lesyk. (2021). Microbial biofilms and some aspects of anti-inflammatory drug use. *Biopolymers and Cell*, 37(4), 247–258. <https://doi.org/10.7124/bc.000a57> (Scopus Q4). (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у написання та оформлення публікації).
2. Руминська Т. Вплив німесулідру та нового похідного 4-тіазолідинону на гематологічні параметри в умовах експериментального запального процесу. *Біологія тварин*. 2023. Т. 25, № 2. С. 33–36. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.02.033> (фахове наукове видання України). (Особистий внесок здобувачки: участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
3. Rumynska, T., & Lavryk, G. (2023). Effect of 4-thiazolidinone derivative and nimesulide on parietal intestinal microbiota of rats during induced inflammation process in vivo. *The Animal Biology*, 25(4), 44–50. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.04.044> (фахове наукове видання України). (Особистий внесок здобувачки: ідея проведення досліджень, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
4. Konechnyi Y, Rumynska T, Yushyn I, Holota S, Turkina V, Ryviuk Rydel M, Sękowska A, Salyha Y, Korniychuk O, Lesyk R. A New 4-Thiazolidinone Derivative (Les-6490) as a Gut Microbiota Modulator: Antimicrobial and Prebiotic Perspectives. *Antibiotics*. 2024; 13(4):291. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040291> (Scopus Q1-Q2) (Особистий внесок здобувачки: ідея проведення досліджень, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

5. T.Rumynska, I.Yushyn, S.Holota, A.Hural, D.Mural, O.Dudok, Y.Salyha, V. Georgiyants, O.Korniychuk, R. Lesyk, Y. Konechnyi. Comparative characteristics of the anti-inflammatory effect of the 4-thiazolidinone derivative LES-6490 and Nimesulide under the conditions of Freund's adjuvant-induced inflammatory process in rats. *Biopolymers and Cell* прийнято до друку станом на 12.01.2024 (Scopus Q4).

Патент України

Електронну заявку на отримання патенту на винахід подано із заявою № 280013 31 січня 2024 року до Міністерства економіки України, Національного органу інтелектуальної власності, Державної організації «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій» (УКРНОІВІ).

Тези наукових доповідей:

6. T. Rumynska A. Hural, Y. Salyha. Influence of NSAIDs on the microbiocenosis of the oral cavity in animals. The first ukrainian-polish scientific forum agrobioperspectives. 29–30 September 2021, Lviv, Ukraine С.97 (*Особистий внесок авторки: участь у проведенні досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

7. Руминська Т.М., Корнійчук О.П. До питання мікробіологічної діагностики мікробних процесів у ротовій порожнині. «Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній і клінічній лабораторній медицині» 2020р. Дніпро С.36 (*Особистий внесок авторки: участь у проведенні досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

8. Konechnyi, Y., Rumynska, T., Yushyn, I. and Lesyk, R., 2022. Newly synthesized 5-pyrazolyl substituted 2,4-thiazolidinedione as potential anti-inflammatory and antimicrobial agent. ESCMID-ASM Joint Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, Dublin, Ireland, 4-7 October 2022, <https://www.escmid.org/dates-events/escmid-conferences/escmidasm-conference->

2022. (*Особистий внесок авторки: участь у проведенні досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

9. М. Сус, Т. Руминська, І. Коваленко. Мікробіом та інтерлейкіновий профіль при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту. Українські медичні. XIX конгрес світової федерації українських лікарських товариств. Українські медичні вісті, 27–29.10.2022 С 140-141 (*Особистий внесок авторки: аналіз літературних джерел, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

10. Т. Руминська, І. Юшин, Ю. Конечний Вплив нестероїдного протизапального препарату німесулідю та нового похідного 4-тіазолідинону на мікробіоту товстої кишки. XXI All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists, Lviv, Ukraine, May 18th–19th 2023 С.75 (*Особистий внесок авторки: участь у проведенні досліджень, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

11. Гураль А., Руминська Т., Мельник О., Павляк У., Конечний Ю. Взаємодія адгезивних властивостей бактерій із компонентами формування біоплівки. Збірник наукових матеріалів XXIV міжнародної науково-практичної інтернет конференції el-conf.com.ua Новини науки XXI століття. м. Вінниця 2019. с.113-117. (*Особистий внесок авторки: аналіз літературних джерел, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

12. Rumynska T., Melnyk O., Pavliak U., Hural A. The connection mechanism of co-operations of biofilm microorganisms and antibiotic resistance. RS Clobal International trends in science and technology Poland. 2019. (*Особистий внесок авторки: аналіз літературних джерел, узагальнення результатів, підготовка тез до друку*).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1	28
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1 Нестероїдні протизапальні препарати, класифікація, структура, механізм дії.....	28
1.2 Одержання та синтез нових груп протизапальних препаратів.....	35
1.2.1 Дослідження біологічних ефектів новосинтезованих тіазолідинонів.	36
1.3 Вплив тіазолідинонів на кишкову мікрофлору	42
1.4 Характеристика кишкового мікробіому людини.....	43
1.5 Вплив мікробіоти на фізіологічні та патологічні процеси в організмі.....	49
1.6 Вплив НПЗП на мікробіоту ШКТ.....	56
Висновки до розділу 1	58
РОЗДІЛ 2	59
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	59
2.1 Характеристика предмету дослідження.....	59
Характеристика хімічної сполуки похідної 4-тіазолідинону та досліджуваного препарату НПЗП.....	59
<i>Синтез хімічної сполуки</i>	59
Дизайн експериментального дослідження	62
2.3 Скринінг новосинтезованих сполук на протимікробну активність.....	63
<i>Визначення протимікробної та протигрибкової дії.</i>	63
2.4 Вивчення впливу сполуки Les-6490 на біоплівкоутворення	63

2.5 Скринінг сполуки <i>in silico</i>	64
2.6 Експериментальні тварини.....	64
2.7 Визначення гострої токсичності похідної 4-тіазолідинону.....	65
2.8 Моделювання запального процесу.....	66
2.9 Експериментальні групи.....	67
2.10 Характеристика методик дослідження	68
2.11 Статистичне опрацювання результатів дослідження.....	73
РОЗДІЛ 3	74
МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	74
3.1 АНТИМІКРОБНА ДІЯ ПОХІДНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНІВ	74
3.2 Вивчення впливу сполуки Les-6490 на біоплівкоутворення.....	78
3.3 Мікрофлора кишки у щурів під впливом німесуліді та сполуки Les- 6490 на фоні індукованого запалення.....	79
Висновки до розділу 3	82
РОЗДІЛ 4	84
ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ КРОВІ ЩУРІВ. ТОКСИЧНІСТЬ СПОЛУКИ.....	84
4.1 Гостра токсичність сполуки Les - 6490 для мишей.....	84
4.2 Дослідження гематологічних показників в умовах дії досліджуваних речовин при запальному процесі індукованому АФ.....	84
4.3 Дослідження біохімічних показників крові тварин при дії німесуліді та сполуки Les-6490 за умов експериментального запального процесу.....	89
Висновки до розділу 4	98
РОЗДІЛ 5	99
ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ІНДУКОВАНОГО АД'ЮВАНТОМ ФРЕЙНДА	99

Висновки до розділу 5	103
РОЗДІЛ 6	104
МЕТАГЕНОМНИЙ АНАЛІЗ	104
6.1. Аналіз складу мікробіомів кишкового каналу експериментальних тварин	104
6.1.1 Відносна кількість таксонів у біоматеріалі окремих групах	105
6.1.2 Дослідження альфа-індексів різноманітності	108
6.1.2.1 Крива біорізноманіття	109
6.1.2.2 Альфа-різноманіття на основі аналізу цілого дерева – PD_whole_tree.	112
6.1.3 Аналіз бета-різноманітності.....	113
6.1.3.1 Аналіз головних компонентів з кластерним перетворенням	115
6.1.3.3. Аналіз процедури перестановки з кількома відповідями (MRPP).....	118
6.2 МІЖГРУПОВИЙ АНАЛІЗ МІНЛИВОСТІ ВИДІВ	120
6.3. Аналіз міжгрупових варіацій видів із застосуванням t -тестового аналізу	127
6.4. MetaStat – аналіз таксонів із значними внутрішньогруповими варіаціями	131
Висновки до розділу 6	133
РОЗДІЛ 7	134
ПОРІВНЯЛЬНА ДІЯ НІМЕСУЛІДУ ТА ПОХІДНОЇ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ СПОЛУКИ LES-6490 НА ПАРІЄТАЛЬНУ МІКРОБІОТУ КИШКИ <i>IN VIVO</i> ПРИ ІНДУКОВАНОМУ ЗАПАЛЬНОМУ ПРОЦЕСІ	134
7.1 Індекс охоплення на основі чисельності окремих видів.....	134
7.2 Дендрограма різноманіття мікробіомів стінки кишкового каналу на рівні типів та класів.....	135

7.3 Домінантні таксони в мікробіомах досліджуваних груп тварин.	136
7.4 Відносна кількість таксонів пристінкових бактерій на рівні видів	139
Висновки до розділу 7	141
РОЗДІЛ 8	142
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ .	142
ВИСНОВКИ.....	158
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	160
ДОДАТКИ.....	202
ПОДЯКИ	214

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АБР – антибіотикорезистентність

АФ – ад'ювант Фрейнда

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

АСЕ – індекс оцінки охоплення на основі чисельності

ДМФА – диметилформахід

ДМСО – диметилсульфоксид

ЗЗК – загальні захворювання кишечника

ІЛ– інтерлейкін

КЛЖК – коротколанцюгові жирні кислоти

КУО – колонієутворювальна одиниця

ЛД₅₀ – напівлетальна доза

ЛПС – ліпополісахарид

ЛФ – лужна фосфатаза

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

ОТУ – операційні таксономічні одиниці

ПВ – процентний вміст

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РА – ревматоїдний артрит

РСА – метод головних компонентів

РСоА – аналіз головних координат

ТМАО – триметиламін- N -оксид

ЦОГ – циклооксигеназа

МК – мінімальна інгібуюча концентрація

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів

ВСТУП

Запальна реакція організму є одним з важливих фізіологічних механізмів захисту організму від інфекційних факторів та важливою ланкою розвитку патологічних процесів залежно від активації тих чи інших медіаторів запалення. Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), що використовують в лікуванні численних хворіб, можуть спричинювати низку побічних ефектів, основним з яких є ульцерогенна дія на слизові оболонки органів шлунково-кишкового тракту, зокрема НПЗП-гастропатія і розвиток виразкової хвороби 12-палої кишки та шлунку. Тривале вживання НПЗП може призвести до кишкового дисбіозу, наслідком якого є патофізіологічні впливи на гепатобіліарну, серцево-судинну, видільну та дихальну системи [29], а також нейропсихологічні порушення. Особливі типи кишкового дисбіозу асоціюються з розвитком колоректального раку [33, 164].

Механізм дії НПЗП базується на інгібуванні активності циклооксигенази (ЦОГ), яка має дві основні ізоформи: конститутивна — ЦОГ-1 та індукбельна — ЦОГ-2, що відрізняються структурно і функціонально [5]. Відповідно усі НПЗП поділяють на селективні та неселективні. Зокрема до селективних інгібіторів ЦОГ-2 відноситься широко вживаний препарат німесулід, який взаємодіє з каскадом арахідонової кислоти і знижує біосинтез простагландинів шляхом інгібування циклооксигенази. Незважаючи на менш виражений ульцерогенний ефект, селективні НПЗП підвищують ризик появи інфаркту міокарду [223]. Враховуючи численні побічні ефекти існуючих нині НПЗП, активно ведеться розробка нових протизапальних засобів, позбавлених побічної дії.

Одним з перспективних підходів є пошук нових протизапальних молекул серед похідних 4-тіазолідинону. З'явилося підтвердження того, що сполуки на основі 4-тіазолідинону мають потужні протизапальні властивості, а також виявляють активність проти бактерій та грибів [163]. Крім того, ці сполуки мають структурну різноманітність та легко модифікуються, що робить їх перспективним класом молекул для розробки нових лікувальних препаратів. До

того, їхня здатність модулювати мікробіоту кишки вказує на можливість додаткових корисних властивостей, окрім протизапальних. Керований вплив на мікробіом організму дає змогу додатково впливати на підтримку гомеостазу та розвиток запального процесу.

Кишковий мікробіом, що заселяє травний канал, починає формуватися після народження, характеризується віковими та популяційними особливостями містить трильйони мікроорганізмів, котрі належать до сотень видів, перевищуючи за кількістю клітин організм людини [184]. Мікробіота кишки бере участь у важливих фізіологічних функціях шлунково-кишкового каналу, зокрема моториці, біотрансформації нутрієнтів, імуномодуляції та розвитку імунотолерантності, синтезі багатьох біологічно активних речовин, зокрема тих, які не утворюються в організмі та не поступають іззовні. Метаболіти, продуковані кишковою мікробіотою, зокрема коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) беруть участь у важливих біохімічних та фізіологічних процесах — забезпечують енергетичні потреби кишкового епітелію, регулюють моторику гладкої мускулатури, впливають на рівень гормонів гіпофіза, попереджують злоякісне переродження колоноцитів [12] .

Навіть при наявних методах лікування, все ще існує потреба в нових терапевтичних підходах, які ефективно борються з запаленням та зменшують активність захворювань без значущих побічних ефектів.

Гранти та НДР в межах яких виконувалася робота

Дослідження, які входять до дисертаційної роботи були проведені згідно планів науково-дослідної роботи лабораторії обміну речовин С.З. Гжицького, Інституту біології тварин НААН упродовж 2020–2024 років відповідно до тематики ДР№0121U108826 «Дослідити вплив екологічних і кліматичних чинників на обмін речовин у тварин та розробити методи попередження метаболічних порушень».

Дослідження було частково профінансоване Міністерством Охорони Здоров'я України — «Дослідження протимікробної та протизапальної

активностей гетероциклічних та сполук природнього походження» [грант номер: 0123U100153].

Дисертаційна робота виконувалась впродовж 2020-2024 років у лабораторії Інституту біології тварин НААН; лабораторіях кафедри мікробіології та фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького, Експериментальному центрі Науково-дослідного інституту епідеміології та гігієни ЛНМУ імені Данила Галицького.

Мета та завдання дослідження

Мета роботи: Порівняльний аналіз протимікробних і протизапальних властивостей та альтераційної дії на кишковий мікробіом новосинтезованого похідного 4-тіазолідинону й відомих нестероїдних протизапальних препаратів на моделі індукованого запального процесу у тварин.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- Дослідити протимікробну дію *in vitro* новосинтезованої сполуки на основі похідних 4-тіазолідинонів з виявленою біологічною та фармакотерапевтичною активністю, обґрунтувати ймовірний механізм дії та сформулювати прогностичні характеристики (*in silico*).
- Оцінити протизапальний ефект новосинтезованого похідного 4-тіазолідинонів при запальній реакції у тварин, змодельованій ад'ювантом Фрейнда і порівняти одержані дані з результатами дослідження протизапальної дії НПЗП німесулід. Провести порівняння протизапальної дії новосинтезованої сполуки та НПЗП (німесулід) *in vivo*.
- Дослідити вплив нового похідного 4-тіазолідинону та НПЗП на фізіологічні зміни організму лабораторних тварин за гематологічними та біохімічними показниками крові.
- Вивчити вплив похідного 4-тіазолідинону та НПЗП на альтерацію кишкового мікробіому тварин із застосування метагеномних досліджень.

Об'єкт дослідження: новосинтезована сполука похідна 4-тіазолідинону — Les-6490 (гібрид піразол-4-тіазолідинону), фізіологічні зміни в організмі тварин за дії Les-6490, зміни видового і кількісного складу основних нормосимбіонтів у мікробіоценозах, екологічне різноманіття кишкових мікробіомів. протизапальні властивості, антимікробні властивості Les-6490.

Предмет дослідження: характеристика протизапальної та протимікробної дії

похідного 4-тіазолідинону в порівнянні з дією НПЗП та вплив сполуки на кишковий мікробіом тварин на тлі змін показників фізіологічного стану організму тварин, біохімічні показники крові.

Методи дослідження:

- *мікробіологічні:* культуральний – виділення мікросимбіонтів; біохімічний – для видової ідентифікації мікроорганізмів; оцінка антимікробної дії;
- *мікроскопічні* (світлова мікроскопія);
- *спектрофотометричні* (визначення оптичної щільності біоплівки);
- *молекулярно-генетичні* (секвенування 16sРНК);
- *біохімічні* (дослідження маркерів ліпідного, білкового, мінерального обмінів, функції печінки);
- *гематологічні;*
- *біологічні:* експериментальне дослідження впливу НПЗП та нової молекули на основі 4-тіазолідину на індукованому запальному процесі *in vivo*;
- *статистичні* дослідження: обробка та аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна

Уперше було досліджено та охарактеризовано біологічну активність нової сполуки 4-тіазолідинону Les-6490 (гібрид піразол-4-тіазолідинону). Виявлена антимікробна активність сполуки щодо стандартних та клінічних штамів патогенних бактерій і грибків, а саме виявлено активність проти *Staphylococcus aureus* та *Saccharomyces cerevisiae*.

Вперше новосинтезована сполука та НПЗП були вивчені на моделі запального процесу в щурів, індукованого ад'ювантом Фрейнда.

Проведено аналіз мікробного вмісту тонкої та товстої кишки мікробіологічними методами та співставлено з дослідженнями з використанням метагеномних послідовностей 16s рРНК. Виконано аналіз таксонів, альфа-різноманіття, бета-різноманіття, аналіз головних координат, аналіз головних компонентів, неметричне багатовимірне шкалювання, метод парних груп з арифметичним середнім, аналіз різниці спільнот, аналіз варіації між групами та метастатичний аналіз між групами.

Встановлено, що похідний 4-тіазолідинону значно впливає на зростання кількісного рівня протизапальних мікроорганізмів (*Blautia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Succivibionaceae*, *Coriobacteriales*) та відновлення еубіотичного складу кишкової мікробіоти, порушеної внаслідок індукованого запального процесу. Також було виявлено ймовірну антитрепонемну активність *in vivo*. Досліджувана сполука Les-6490 має потенційну пребіотичну активність з непрямим протизапальним ефектом; сполука Les-6490 впливає на склад мікробіомів кишкового каналу щурів подібно до нестероїдного протизапального препарату німесулід, але така дія за результатами метагеномного дослідження проявляється більшою мірою відносно окремих таксонів мікробіоти. Вивчено вплив сполуки на показники запального процесу та маркери ліпідного, фосфорно-кальцієвого обміну та визначено маркери гепатотоксичності в умовах дії досліджуваної сполуки та препарату порівняння (німесулід).

Практичне значення отриманих результатів

Одержані результати наукового дослідження розширюють знання про мікроекологію кишкового каналу та інтестинальну мікробіоту завдяки результатам дослідження із застосуванням метагеномного аналізу. Виявлені властивості новосинтезованого похідного 4-тіазолідинону вказують на його потенційні властивості як протизапальної та мікроекологічно значущої сполуки з непрямою протизапальною дією і відкривають перспективи подальших

досліджень з метою впровадження у фармацевтичну промисловість України та в практичну фармакотерапію.

Результати впроваджено в навчально-педагогічний процес кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Особистий внесок здобувачки

Дисертантка самостійно провела патентно-інформаційний пошук та проаналізувала джерела літератури, виконала експериментальну частину, узагальнення результатів та формулювання положень і висновків роботи, статистичну обробку даних. Самостійно обрала методику та аргументовано вибір методик дослідження.

Співавторами наукових праць є наукові керівники, науковці, з якими проводились спільні фізико-хімічні та біологічні дослідження [290]. Усі розділи дисертації написані авторкою самостійно. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, використано фактичний матеріал досліджень авторки.

Апробація результатів

Основні положення дисертаційної роботи було представлено на науково-практичних конференціях:

- XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича ШАВКУНА, Львів 2023 р.;
- ESCMID-ASM Joint Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, Dublin, Ireland (4-7 October 2022);
- XIX Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (СФУЛТ), Ужгород (27–29.10.2022);
- The 1st Ukrainian-Polish Scientific Forum "AGROBIOPERSPECTIVES" in Lviv (15-16 вересня 2021 р).
- Науково-практична конференція присвяченої пам'яті відомого вченого-мікробіолога, доктора медичних наук, професора І.Л. Дикого, Харків (19 березня 2020 р.);

- XXIV міжнародної науково-практичної інтернет конференції eI-conf.com.ua Новини науки XXI століття. м. Вінниця 2019.
- Звітні конференції аспірантів ІБТ НААН (Львів 2020, 2021, 2022, 2023, 2024 рр.).

Публікації

Основні положення дисертаційної роботи опубліковані у 11 наукових працях, зокрема у 4 статтях, з яких 2 включені до міжнародної бази даних Scopus, а також 7 тезах доповідей у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних конференцій та конгресів.

Структура та обсяг роботи

Дисертація викладена українською мовою на 214 сторінках друкованого тексту. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, п'ятих розділів власних досліджень, висновків, списку використаної літератури та додатків. Робота ілюстрована 17 таблицями та 36 рисунками. Список використаних джерел містить 290 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Нестероїдні протизапальні препарати, класифікація, структура, механізм дії

До нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) відноситься велика група різних за хімічною структурою синтетичних хімічних речовин, які проявляють ряд клінічно важливих ефектів. У клінічних аспектах НПЗП виявляють протизапальну, анальгетичну та антипіретичну дію, що зумовило їх широке використання як лікарських засобів. За підрахунками, кожен день приблизно 30 мільйонів людей у всьому світі вживають ці препарати з лікувальною метою [261].

Першим препаратом цієї групи була ацетилсаліцилова кислота (рис. 1.1), вперше синтезована співробітником фірми Bayer AG Феліксом Гофманом 10 серпня 1897 року, а через два роки було одержано патент під назвою «Аспірин» [224].

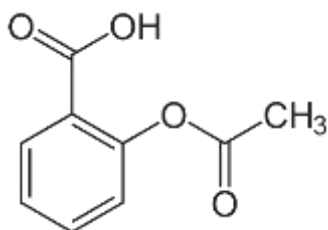


Рис. 1.1 Ацетилсаліцилова кислота – аспірин

Вважається, що ацетилсаліцилова кислота - це єдиний синтетичний лікарський препарат, який не тільки застосовується понад 120 років, але й постійно розширює сферу застосування, а його ефективність відповідає принципам доказової медицини.

Класифікація НПЗП за хімічною структурою

За хімічною структурою НПЗП поділяють на ряд груп, які в свою чергу поділяються на підгрупи [70].

Структура основних сполук, на основі яких одержані лікувальні препарати, показана на рис. 1.2 - 1.4.

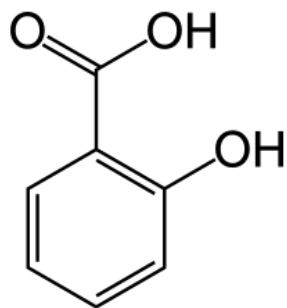


Рис 1.2 Саліцилова кислота (<https://uk.wikipedia.org/wiki/>')

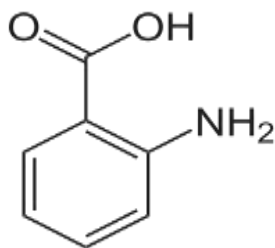
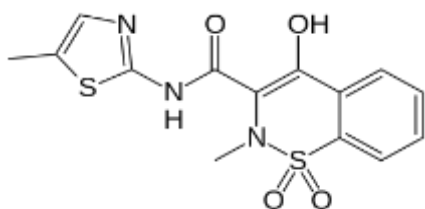


Рис 1.3 Антранілова кислота

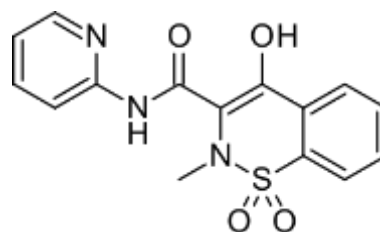
До першої групи НПЗП віднесено похідні кислот:

- Похідні арилкарбонівих кислот, до яких належать саліцилова кислота (саліцилати): ацетилсаліцилова кислота, дифлунісал, трисаліцилат, бенорилат, саліцилат натрію, а також похідні антранілової кислоти (фенамати): мефенамова кислота, ніфлумова кислота, меклофенамова кислота, флуфенамова кислота, толфенамова кислота.
- Похідні арилалканових кислот, такі як аклофенак, фентіазак, фенклофенак.
- Похідні арилоцтової кислоти, такі як кеторолак, толметин, зомепірак, триметамін, клоперак.
- Похідні індол/інденоцтової кислоти, такі як суліндак, етодолак, ацеметацин.
- Похідні арилпропіонової кислоти, такі як ібупрофен, фенбуфен, флурбіпрофен, супрофен, кетопрофен, індопрофен, напроксен, пірпрофен, тіапрофенова кислота, фенопрофен.

- Енолікові кислоти, такі як похідні піразоліну: фенілбутазон, оксифенілбутазон, азапропазон та оксиками: піроксикам, мелоксикам, судоксикам, ізоксикам .



Мелоксикам



Піроксикам

Рис. 1.4 Похідні енолікових кислот.

До другої групи віднесено:

- Деякі інші похідні: німесулід, целекоксиб, рофекоксиб, буфексамак, тіноридин, набуметон, флурпроквазон, парацетамол, флуфізон, проквазон, епіразол.

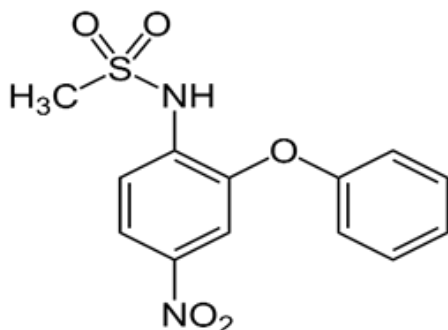


Рис. 1.4 Структурна формула німесуліду

До третьої групи віднесено:

- Комбіновані препарати: диклор, артротек, аспіфат та ін.

На рис. 1.5 показано структурні формули деяких найбільш поширених НПЗП [29, 30, 126].

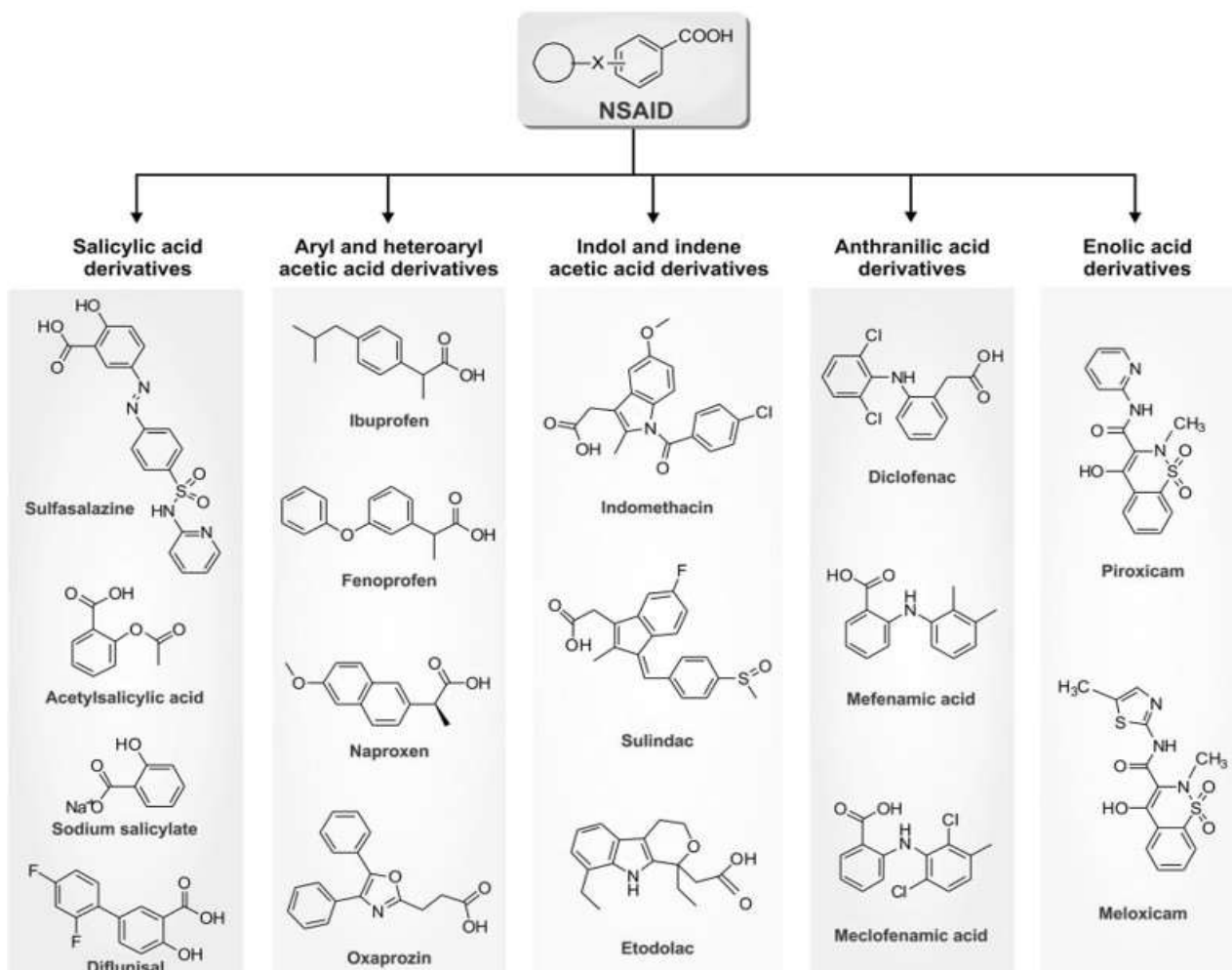


Рис.1.5 Структурні формули деяких НПЗП (<http://surl.li/otozi>)

Наведені формули ілюструють, що завдяки зусиллям дослідників в галузі медичної хімії шляхом багатоетапного синтезу одержано десятки препаратів, які знаходять застосовуються в клінічній медицині та ветеринарії [30].

У клінічній практиці застосовують класифікацію НПЗП на основі механізмів дії, напрямків застосування та інших клінічно важливих критеріїв.

Механізм дії НПЗП

Первинний механізм дії НПЗП полягає в пригніченні ферментів циклооксигеназ (ЦОГ). Очищені препарати цих ферментів одержані ще в

минулому столітті, а вивчення молекулярних механізмів їх дії на фізіологічні чи патофізіологічні наслідки продовжують вивчатися [69, 215, 270].

Основний механізм дії ЦОГ полягає в біохімічних реакціях, котрі призводять до утворення простагландинів шляхом перетворення арахідонової кислоти. Простагландини – це гормоноподібні сполуки, що мають широкий спектр дії, модулюючи фізіологічні процеси в центральній нервовій системі (ЦНС), серцево-судинній, дихальній та ендокринній системах, шлунково-кишковому тракті (ШКТ) та сечостатевиx органах. Важливою функцією простагландинів є вплив на процеси запалення – прозапальна чи протизапальна дія, а також імуноопосередковані процеси. На молекулярному рівні простагландини проявляють свою дію шляхом активації трансмембранних рецепторів, пов'язаних з білком G (GPCR) [88, 156, 221].

Циклосигенази відомі в ізоформах ЦОГ - 1 та ЦОГ - 2. ЦОГ - 1 присутня у більшості клітин організму. ЦОГ - 2 виявляють у клітинах ЦНС та нирок, а також в кістковій тканині. Доведено існування третього ізомеру ЦОГ – ЦОГ - 3, котра міститься у клітинах, зокрема в гіпоталамусі. З ЦОГ - 3 пов'язують селективну дію піроксикаму у головному мозку. Її інгібування призводить до зменшення вмісту простагландину-2, що лежить в основі центрального механізму жарознижувальної та анальгетичної дії піроксикаму й метамізолу натрію [4, 134, 207].

Класифікація НПЗП за вибірковістю дії

За вибірковістю дії розрізняють неселективні, селективні та високоселективні препарати щодо впливу на ЦОГ-1 і ЦОГ-2. Коефіцієнт селективності визначається як відношення ступеня інгібування ЦОГ-1 до ЦОГ- 2. До високоселективних препаратів відносять ті, для яких цей коефіцієнт становить 1:50. До цієї групи належать препарати: вальдекоксиб, рофекоксиб, еторикоксиб, луміракоксиб (перелік за ступенем зростання коефіцієнта селективності. До найменш селективних НПЗП, за даними [70] відносяться (перелік за ступенем зменшення коефіцієнта селективності): ацетилсаліцилова

кислота, індометацин, кетопрофен, фенпрофен, кеторолак. До селективних НПЗП віднесено диклофенак, німесулід, мелоксикам, етодолак, целекоксиб – (перелік за ступенем зростання коефіцієнта селективності). Наведені дані вказують що препарати з різним ступенем селективності можуть належати до різних груп за хімічною структурою.

Лікувальна та побічна дія НПЗП

Клінічні рекомендації та протоколи передбачають застосування НПЗП за синдромним і нозологічним принципами при лікуванні гострих і хронічних захворювань, патогенетичними та клінічними проявами яких є запальні процеси, больовий синдром, підвищення температури тіла різного ступеня і тривалості. Найбільш повна і доступна інформація про НПЗП міститься в монографії [70], а також у публікаціях [22, 50, 89, 201, 279].

Побічні ефекти НПЗП можуть виявлятися в різних формах, і їх частота та інтенсивність залежать від конкретного препарату, тривалості прийому та індивідуальних особливостей кожного пацієнта. Зазвичай вони проявляються в розладах шлунково-кишкового тракту, таких як біль, здуття, нудота та блювота. У деяких осіб може приєднатись ульцерогенний ефект, що проявляється у виникненні ерозій та пептичних виразок у шлунку, а також можливі кровотечі та перфорації стінок. Важливо враховувати підвищений ризик ураження шлунку у пацієнтів, які приймають НПЗП на фоні гелікобактерної інфекції [17, 95, 238].

Ураження тонкої та товстої кишки може проявлятися через діарею, метеоризм та синдром ентеропатії. Ураження нирок може призводити до інтерстиціального нефриту, що впливає на клубочкову фільтрацію, призводячи до ниркової недостатності та уремії. Гепатотоксичність проявляється збільшенням рівня трансаміназ у крові через ураження паренхіми печінки. Кардіотоксичний ефект може виявлятися підвищенням артеріального тиску та розвитком серцевої недостатності [279].

Управління контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів попереджає щодо підвищеного ризику серцевого нападу та інсульту для всіх НПЗП, за винятком аспірину [84]. Вплив на ЦНС може проявлятися головним

болем, запамороченням та порушенням концентрації уваги. До частих побічних ефектів на кров входять лейкопенія, тромбоцитопенія, порушення гемостазу та гемолітична анемія. Алергічні реакції, такі як висипання на шкірі, свербіж та іноді бронхоспазм, також можуть бути виявлені як реакція на ці препарати [17, 34, 196].

Протимікробна дія НПЗП

Німесулід виявив протигрибкову дію, пригнічуючи ріст грибів проти *Trichophyton mentagrophytes* і *Cryptococcus neoformans* МІК 2 – 62 мкг/мл і проти *Trichophyton mentagrophytes* (АТСС 9533) і *Cryptococcus neoformans* при значенні МІК 112 до 770 мкг/мл. Пригнічення росту грибів пов'язується з інгібуванням грибкових простагландинів, що вказує на спільні механізми впливу НПЗП на клітини грибів і клітини людини [52, 205].

В експерименті на моделі зовнішнього отиту спричиненого *S. aureus* у щурів, досліджувалась протимікробна і протизапальна дія німесуліду. Виявлено, що при застосуванні цефазоліну спостерігається значний протимікробний ефект, ніж при дії німесуліду, але при цьому німесулід спричинив більш виражений клінічний ефект – зменшення почервоніння та набряку, пригнічуючи рівень прозапальних цитокінів, тоді як при використанні цефазоліну ці показники зростали. На думку авторів німесулід може бути використаний як монопрепарат або в комбінації з цефазоліном при лікуванні зовнішнього бактерійного отиту [64]. У ряді досліджень останніх років досліджувалась здатність НПЗП впливати на утворення бактеріальних біоплівочок оскільки ці структури є факторами вірулентності, зокрема зумовлюють резистентність до антибіотиків [181, 209].

У роботі *in vitro* виявлено, що диклофенак та ібупрофен пригнічують утворення біоплівочок при концентраціях близьких до вмісту цих препаратів у плазмі крові при застосуванні їх з лікувальною метою. Механізми дії НПЗП відрізнялися у різних видів мікроорганізмів: у стафілококів блокувались гени вірулентності, а в *Pseudomonas aeruginosa* пригнічувався феномен «quorum sensing» - залежність вірулентності від кількості бактерій у місці ураження.

Автори вважають, що потрібні додаткові дослідження для з'ясування клінічної ефективності НПЗП при процесах, зумовлених бактеріями-продуцентами біоплівки [181]. У роботі [236] досліджувалась поєднана дія ібупрофену та ацетилсаліцилової кислоти з антибіотиками ципрофлоксацином, гентаміцином, цефепімом, імipенемом і меропенемом на мультирезистентні ізоляти *S. aureus* та *P. aeruginosa*, а також на їхню здатність до формування біоплівок. При цьому встановлювався комбінований вплив зазначених препаратів на показники МІК (мінімальні інгібуюча концентрація), а також на транскрипцію генів, відповідальних за формування біоплівок в зазначених бактеріях. Показано, що ібупрофен та ацетилсаліцилова кислота знижують МІС для MRSA-стафілококів у комбінаціях з деякими антибіотиками, а у *P. aeruginosa* спостерігався знижений рівень транскрипції генів, відповідальних за формування біоплівок. Автори вважають, що на основі комбінацій НПЗП з антибіотиками можна розробити нові препарати, які повинні впливати на мультирезистентні варіанти мікроорганізмів та на бактерії, що здатні формувати біоплівки. У подібних дослідженнях [11] встановлено, що на основі нановолокон, котрі вміщали в ібупрофен і парацетамол, одержано препарати, котрі проявляли антибактеріальну активність проти *S. aureus*, *E. Coli* та *E. faecali* або на 50% пригнічували формування біоплівки *P. aeruginosa*.

Вивчали також вплив НПЗП препаратів на мікобактерії туберкульозу [85, 153, 154]. Виявлено, що ібупрофен та його синтетичні похідні проявили активність проти мікобактерій, а 3,5-нітроібупрофен пригнічував розмноження мультирезистентних ізолятів. Отже, НПЗП, окрім основної протизапальної дії, проявили антимікробну активність проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, мікобактерій туберкульозу та грибів. Автори цих робіт наголошують на потребі подальших дослідженнях.

1.2 Одержання та синтез нових груп протизапальних препаратів

Аналіз зазначених вище наукових даних свідчить, що НПЗП широко застосовуються. Однак їх ефективність визначається діагнозом, формою

перебігу та індивідуальними особливостями пацієнта. У значущому відсотку випадків НПЗП можуть викликати побічні реакції, що вимагають заміни або відміни препарату. Попри широкий асортимент НПЗП, постійно ведуться пошуки та вивчення нових препаратів.

Один із нових напрямків досліджень включає синтез та вивчення біологічних ефектів похідних тіазолідинонів.

1.2.1 Дослідження біологічних ефектів новосинтезованих тіазолідинонів.

Гетероциклічні органічні сполуки, що містять азот, кисень і сірку, широко розповсюджені в природі. У галузях органічної та медичної хімії синтез і вивчення цих сполук займають провідне місце. Вважається, що більше як 70% лікарських препаратів одержані на основі цих речовин. Однією з найважливіших сполук є 1,3-тіазолідин-4-он, який називають «магічною молекулою», оскільки його похідні мають широкий спектр біологічної активності. Вони проявляють протипухлинну, антибактеріальну (включаючи пригнічення утворення біоплівки), противірусну та антипротозойну дію. Також вони викликають протизапальні, анальгетичні, антипіретичні ефекти та антигістамінний ефект [100, 191] рис1.6.

Способи синтезу і дослідження властивостей похідних 4-тіазолідинонів здійснюється співробітниками кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького під керівництвом професора Романа Лесика. В опублікованих статтях і матеріалах дисертаційних робіт зазначено широкий спектр біологічної активності новосинтезованих препаратів [111, 112, 119, 122, 130].

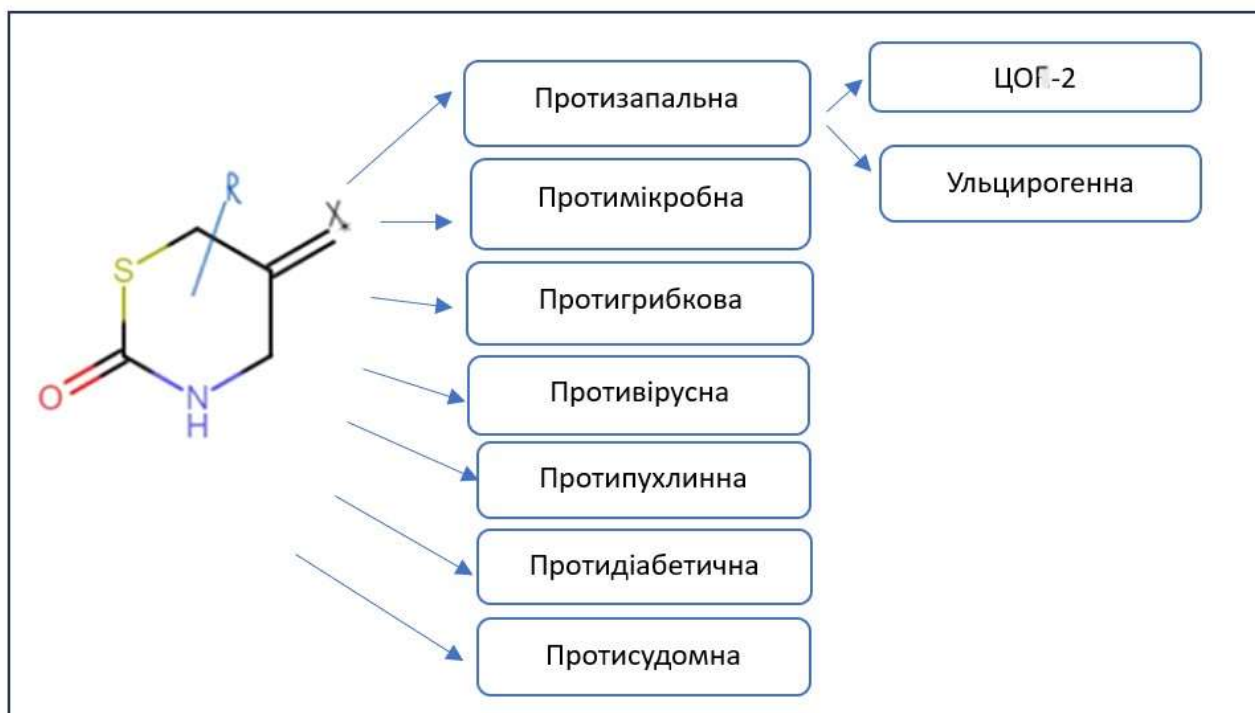


Рис. 1.6 Біологічна дія тіазолідинонів.

Сучасні дані про способи, шляхи синтезу та про біологічну дію гетероциклічних сполук світовій літературі приведено в книзі [133].

Антибактеріальна та протигрибкова дія похідних тіазолідинонів

У роботі [254] автори вивчають дію похідних 1,3-тіазолідин-4-ону. *In vitro* ці сполуки проявили антибактеріальну, протигрибкову та протівірусну дію. Попередні результати показали, що в більшості сполук виявлено помірну або хорошу антимікробну активність, порівняно зі стандартними препаратами. У якості препаратів-порівняння використовували хлорамфенікол, рифампіцин та іконазол. 4-тіазолідинонові сполуки проявили помірну активність щодо грамположитивних бактерій та грибів, але виявили більш виражений ефект щодо грамнегативних бактерій. При дослідженні інших сполук виявили, що МІК препарату щодо *Bacillus subtilis* становив 270 Іг/мл. Дія сполуки 3-(1,5-диметил-3-оксо-2-феніл-2,3-дигідро-1Н-піразол-4-іл)-2-с (2-гідрокси-3,5-дйодфеніл) 4-тіазолідинону на *Escherichia coli*, *B. subtilis*, і *Salmonella typhi*, залежала від виду замісників на С-2 і N-3 тіазолідинонового кільця. Найвищу дію мали препарати, що містили антипирин у N-3 та 3-йод заміщене фенільне кільце у С-2. Більшість

похідних 2-тіоксо-4-тіазолідинонів і 4,40-біс(2-тіоксо-4-тіазолідинон-3-іл)дифенілсульфону проявили активність проти *Bacillus cereus* і *S. aureus*. Зокрема виявлено, що препарати з сульфоаміонними та тіоксогрупами показали вищу антибактеріальну активність щодо *B. cereus*, тоді як препарати з піримідиновим ядром, сульфоаміонфенілом і тіоксо фрагментами виявили вищу активність щодо *S. aureus* [214]. У роботі [1] досліджували дію новосинтезованих тіазолідинонів (Рис 1.7) на *B. subtilis*, *Bacillus megaterium*. Як референтні препарати використовували ампіцилін та хлорамфенікол. Досліджувані сполуки проявили дію на бактерії за кількісними показниками співрозмірну з референтними препаратами.

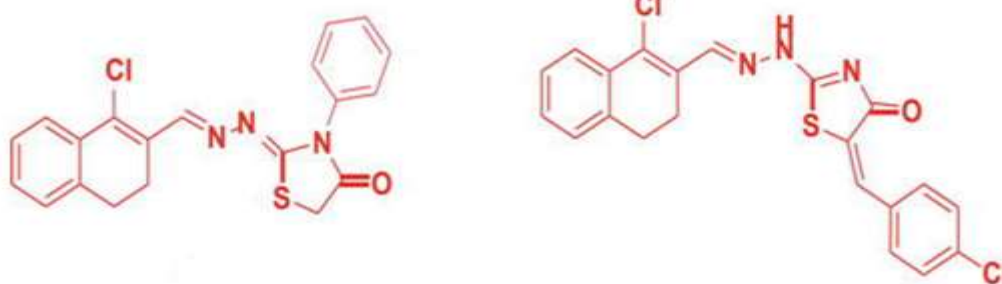


Рис. 1.7 Новосинтезовані сполуки похідних тіазолідинонів.

Оскільки світову загрозу становлять резистентні до хіміопрепаратів збудники туберкульозу, важливим є дослідження дії тіазолідинонів на *Mycobacterium tuberculosis*. У публікації [31] показано, що N-[(2Z)-3-(4-бромфеніл)-4-оксо-1,3-тіазолідин-2-іліден]-2-(піразин-2-50ілокси) ацетогідразид, крім впливу на грамнегативні бактерії (*E. coli* та *S. typhi*) та грампозитивні бактерії (*S. aureus* та *B. subtilis*), також проявив антибактеріальну дію проти еталонного штаму H37Rv *M. tuberculosis*. Досліджували протитуберкульозну активність похідних N'-піридил-N'-тіазолідгідразину автори [247]. Виявлено, що антимікобактеріальна дія препаратів залежить від 2-піридилільні та 2-гідрокси-5-метоксифенільні груп, тоді як препарати, що містили 3-піридилільні та 4-піридилільні групи такої активності не проявляли. Сполуки

виявили високу протимікобактеріальну активність: 50% пригнічення росту виявлені при концентрації 6, 22 мкг/мл, а 90% - при 6,78 мкг/мл.

У дослідженнях [122] виявлено серед новосинтезованих індолін-тіазолідинонів гібридів сполуки з протимікробним ефектом щодо *E. coli*, *Staphylococcus lentus* і *C. albicans* зі значеннями у МІК/ МВС/ МФС в діапазоні 25-50 мкг/мл. У публікаціях [246] наведені результати досліджень новосинтезованих сполук похідних 4-тіазолідинонів як потенційних антимікробних агентів. Антибактеріальну активність досліджували щодо таких видів бактерій: грампозитивних - *B. cereus*, *M. luteus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, грамнегативних – *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*. Як референтні препарати використовували стрептоміцин і ампіцилін. Досліджувані сполуки виявили високу антибактеріальну дію, що перевищувала МІК референтних препаратів. Дослідження взаємозв'язку структура — дія показало, що антибактеріальна активність сполук залежала від природи замісників та їх положення в бензотіазольному циклі, а також від природи і положення замісників у бензольному циклі. Досліджувані бактерії показали різну чутливість до новосинтезованих сполук. Найбільш чутливою серед грамнегативних бактерій виявилася *E. cloacae*. Виявлено також високу чутливість *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, при цьому МІК дорівнював 0,008/0,016 мг/мл. Серед грампозитивних бактерій найстійкішим виявився *S. aureus*, а високочутливим — *M. luteus* та *L. monocytogenes*. У загальному, діапазон МІК для сполук, що проявили антибактеріальну активність, становить для грампозитивних бактерій 0,008–0,32 мг/мл і для грамнегативних — МІК 0,1–0,3 мг/мл, тоді як для референс-препаратів стрептоміцину — 0,025–0,1 мг/мл та ампіциліну — 0,1–0,3 мг/мл. Найбільш активні із синтезованих сполук досліджено на протимікробну дію щодо видів бактерій *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* та *E. coli*, резистентних до референс-препаратів. Досліджені сполуки перевершили протимікробну дію ампіциліну проти всіх трьох видів бактерій, тоді як стрептоміцин не впливав на такі бактерії. Проте досліджувані сполуки не

пригнічували здатність бактерій до утворення плівки. Також не виявлено синергізму щодо дії новосинтезованих сполук і стрептоміцину.

Протигрибкова дія похідних тiazолідинонів

У своїй роботі [54] автори одержали піразол-піридинові гібриди на основі 4-тіазолідинону. Одна зі сполук проявила активність проти *C. albicans* при значення МІК 250 мкг/ мл, що вдвічі перевищує активність стандартного протигрибкового препарату. У дослідженні [173] виявлено, що С-3 заміщені аналоги тіазолідинонів показали протигрибкову активність щодо патогенного виду *Sporothrix*, не пов'язану з функціями тіосемікарбазону або тіазолідинону. Препарати показали синергічну дію до стандартного протигрибкового препарату ітраконазолу. Активність гібридів 5,6,7,8-тетрагідроімідазо [1,2] піразину проти *Sporothrix* залежала від заміщення в імідазопіразиновому кільці. Автори вказують на можливе використання цієї серії сполук як альтернативних препаратів для лікування процесів, спричинених резистентними варіантами *Sporothri*.

Дія тіазолідинонів на протозої

У ряді досліджень виявлено дію похідних-4 тіазолідинонів на еукаріотичні організми — найпростіші. У дисертаційній роботі [282] виявлено, що 3- та 5-піридинілзаміщені 5-амінометилен-4-тіазолідинони проявили активність щодо *Trypanosoma brucei* та *Trypanosoma brucei gambiense* в мікромолярних концентраціях із задовільними індексами селективності. Активність щодо *Trypanosoma brucei gambiense* виявила сполука 8-(трет-бутил)-4-(4-хлорофеніл)-2-[(Z)-1-(4-метоксифеніл)метиліден]-1-тіа-4-азаспіро[4,5]декан-3- [289].

У дослідженні [131] виявлено, що похідні тіазолідинону з антитрипаносомними та протипухлинними властивостями в мікромолярних концентраціях пригнічують ріст *Plasmodium falciparum*.

Противірусна активність тіазолідинонів

Дослідження протівірусної активності протипухлинного агента 5'-[(Z)-(4-ізопропілбензиліден)]-3'-(4-хлорофеніл)-спіро[3H-індол-3,2'-тіазолідин]-2,4'(1H)-діон впливає на репродукцію вірусу гепатиту С, пригнічуючи вірусну РНК-залежну-полімеразу. 5-[(Z)-(4-нітрофеніл) метиліден)] -2,3-ди(4-хлорофеніл) - 4- тіазолідинон впливає на процес репродукції вірусів коров'ячої віспи та вісповакцини, а 3-(4-діетиламінофеніл)-2-(4-диметиламінофеніл)-4-тіазолідинон схарактеризовано як потенційний агент щодо коронавірусу SARS. На основі результатів молекулярного докінгу протівірусної активності 5'-[(Z)-(4-карбоксиметилокси-3-метоксибензиліден)]-3'-(4-гідроксифеніл)-спіро [3H-індол-3,2'-тіазолідин]-2,4'(1H)-діон ідентифікується як сполука з високою активністю щодо вірусу Такарібе – РНК- вірусу родини аренавірусів — збудників особливо небезпечних геморагічних лихоманок, котрі вважають потенційними агентами біологічної зброї [289].

Серед похідних (Z)-5-((4'-(нафтален-1-іл)-[1,1'-біфеніл]-4-іл)метилен) тіазолідин-2,4-діон показав найвищу протівірусну активність щодо вірусу гепатиту В [240]. Також є повідомлення про здатність похідних тіазолідинонів пригнічувати репродукції вірусу імунодефіциту людини [233].

Протизапальна та знеболювальна дія тіазолідинонів

Про протизапальну та анальгезуючу дію похідних тіазолідинонів описано в публікації [132]. Автори наголошують на тому, що традиційні засоби протизапальної терапії мають виражені побічні ефекти, тому пошук нових препаратів є виправданим і необхідним. Протизапальну дію виявили у сполуках, які містили хлор або бром у ароматичних кільцях. Сполуки хіназолінону з тіазолідиноном досліджували на моделі запального процесу лапки щурів, який викликали карагеніном, та підтвердили анальгезуючу та протизапальну дію [28]. Протизапальний ефект досліджували і на моделі культури клітин гладких м'язів верхніх дихальних шляхів люди [114, 277]. Встановлено, що тіазолідинони зменшували вивільнення прозапального інтерлейкіну ІЛ-6 та фактору росту ендотелію судин, які індуковані ІЛ-1 β . Також виявлено зниження вивільнення

еотаксину (індуктора еозинофілозалежних запальних реакцій) під впливом TNF- α . Дослідники прийшли до висновку, що тiazолідинони пригнічують вивільнення різноманітних медіаторів запалення з клітин гладкої мускулатури дихальних шляхів людини. Це свідчить про те, що ці сполуки можуть бути корисними при лікуванні астми. Також висловили гіпотезу, що протизапальна дія тiazолідинонів пов'язана з пригніченням індукції ЦОГ-2.

Порівняно з традиційними протизапальними препаратами, тiazолідинони характеризується більш різноманітними механізмами протизапальних впливів, через пригнічення індукції медіаторів запалення на рівні транскрипції і РНК - білків, пептидів, глікопротеїнів цитокінів, а також продукції нітрит-оксиду та вільних радикалів кисню [2]. У праці [200] показано, що, при дослідженнях впливу двох новосинтезованих тiazолідинонів на синтез медіаторів запалення моноцитами периферійної крові, сполуки значно знижували рівні ІЛ-17А, інтерферону (IFN γ), інтерлейкінів ІЛ-6, ІЛ-17, ІЛ-17А та ІЛ-22, порівняно із стандартним препаратом метилпреднізолоном.

1.3 Вплив тiazолідинонів на кишкову мікрофлору

Тiazолідинони набули широкого застосування як протидіабетичні препарати [13, 62, 82, 255]. Ряд робіт опублікували результати досліджень про вплив антидіабетичних препаратів, зокрема метформіну на мікрофлору кишкового каналу при діабеті. В експерименті на щурах було показано, що метформін, як монопрепарат ефективно знижує рівень цукру в крові. При цьому знижується мікрофлора кишкового каналу щурів з переважанням роду *Lactobacillus* [272]. Вплив метформіну на мікрофлору кишкового каналу висвітлено в огляді [135], показано, що метформін сприяє розвитку бактерій – продуцентів коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖЛ), зокрема це стосується макроорганізмів, в типу Steria й родин Blautia, Bacteroides, Butyricoccus та Phascolarctobacterium, що належать до типу Proteoba, а також родів Allobaculum і Lactobacillus. В експерименті виявлено наростання великої кількості мікроорганізмів родин Rikenellaceae, Ruminococcaceae та Verrucomicrobiaceae, а також *Alistipes spp.*, *Akkermansia spp.*, *Clostridium spp.* На рівні родів було

виявлено збільшення кількості *Escherichia* та зменшення *Intestinibacter* у групі, яка отримувала метформін. На основі аналізу ряду досліджень автори доходять до висновку, що основна дія антидіабетичних препаратів опосередковується через вплив на мікрофлору кишкового каналу. Цей вплив забезпечується синтезом певних метаболітів, зокрема КЛЖК – лактату та сукцинату.

1.4 Характеристика кишкового мікробіому людини

На кожному етапі дослідження мікрофлори кишкового каналу, які розпочались ще в позаминулому столітті, з'являються нові факти, які вказують на важливе місце цих мікроорганізмів (мікробіоти) в життєдіяльності людини. Сучасні дослідження показують, що кишкову мікробіоту слід віднести до визначальних факторів у здоров'ї та в поширенні глобальних захворювань людини [69, 86, 258].

До мікробіоти, згідно з теперішнім значенням цього терміну, зараховують передусім одноклітинні прокаріотичні мікроорганізми – археї та бактерії, одноклітинні та багатоклітинні гриби, віруси, а також еукаріотичні організми – протозої, а також багатоклітинні паразити людини. До складу мікробіому входять геноми мікроорганізмів, які можна досліджувати традиційними методами, а також ті, які виявляються тільки при метагеномних дослідженнях [113, 172]. Широкі дослідження кишкової мікрофлори обґрунтували концепцію про її значення як особливого органу людини та тварин. Як і кожен орган, кишковий мікробіом забезпечує певні функції, важливі для всього організму, а при його порушеннях розвивається ряд патофізіологічних процесів, які в кінцевому етапі ведуть до розвитку патологічних змін. У дослідженнях останнього десятиліття вивчається механізм дії кишкової мікробіоти як в біотопі кишкового каналу, так і вплив на організм - господар у цілому як у тварин, так і в людини [20]. Проте, у 2020 році була опублікована робота, де автори ставлять під сумнів визначення мікробіому кишкового каналу як окремого органу. Замість цього автори вважають, що мікробіота кишки є чужорідним агентом довкілля, який під час еволюції адаптувався та був сприйнятий організмом-господарем як буферна система в обміні енергії. Ця система взаємодіє з енергетичними

потребами організму, отримуючи їх з їжі. При цьому кишкова мікрофлора першою реагує на зміни в енергетичному субстраті, що може проявитися у вигляді дисбіотичного стану, який врешті-решт призводить до розвитку захворювань. Однак автори вказують на дискусійність такого підходу, підкреслюючи необхідність подальших досліджень механізмів взаємовпливу мікробів та макроорганізму [25, 202].

Склад кишкового мікробіому

Кишковий мікробіом вивчається на індивідуальному рівні з визначенням топографічних, вікових, генетичних та інших особливостей організму людини [235]. Сучасні дослідження із застосуванням метагеномних технологій показали, що кількість мікроорганізмів у кишковому каналі становить порядку $3,8 \times 10^{13}$, тобто є співрозмірною або навіть переважає кількість клітин організму людини [217]. Але кількість специфічних нуклеотидних послідовностей, тобто генів мікроорганізмів значно вища – порядку 3×10^6 , що у 150 разів перевищує кількість генів у генетичному апараті людини. Видові та кількісні характеристики ШКТ людини відрізняються у різних відділах цього каналу. Зазначені показники піддавалися впливу кислотності, аерації, наявності травних ферментів тощо. У шлунку, завдяки високій кислотності, кількість мікроорганізмів мінімальна, виявляються окремі представники родів *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia* та *Haemophilus*.

Бактерії, що належать до класів Firmicutes і Proteobacteria, переважають у шлунку та дванадцятипалій кишці, тоді як в інших відділах вони виявляються в мінімальних кількостях [116, 117, 192]. Окремо характеризуються бактерії роду *Helicobacter*, які часто інфікують шлунок (до 90% усієї мікрофлори), а вірулентні варіанти мають ульцерогенну та канцерогенну дію. *H. pylori* та заходи щодо її ерадикації впливають на мікрофлору інших відділів кишкового каналу, змінюючи альфа-різноманіття. У інфікованих осіб *H. pylori* виявлено підвищену чисельність *Proteobacteria*, тоді як кількість *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*,

Fusobacteria та *Firmicutes* знижується [178, 264]. Методом секвенування 16S рРНК показано кореляцію між *H. pylori* й такими видами як *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium unclassified*, *Pedobacter unclassified*, *Stenotrophomonas unclassified*, *Variovorax unclassified* і *Pseudomonas stutzeri* [71]. Слід зазначити, що бактерії роду *Helicobacter* поширені серед різних видів ссавців, зокрема у лабораторних щурів [97, 98]. *Helicobacter* легко колонізують поверхню шлунково-кишкового тракту завдяки мікроаерофільному метаболізму, спіралеподібній формі та особливій рухливості [227]. Залежно від їх розташування в шлунково-кишковій системі їх поділяють на шлункові гелікобактерії, такі як *H. pylori*, і кишково-печінкові гелікобактерії, які переважно колонізують кишківник і гепато-біліарну систему і відіграють захисну роль щодо розвитку певних аутоімунних процесів [196]. Крім того, *Helicobacter* може індукувати вироблення антибактеріальних пептидів, які протидіють потенційно шкідливим бактеріям [263], або конкурують з бактеріями за ту саму екологічну нішу.

Особливості мікробіоти тонкої кишки висвітлені в огляді [115]. Тонка кишка характеризується значними анатомо-фізіологічними особливостями: аеробними умовами, великою площею поверхні, наявністю протеолітичних ферментів, жовчі, а також містить значну кількість поживних речовин та антимікробних пептидів. Тонка кишка забезпечує найважливіші функції ШКТ, такі як перетравлювання і всмоктування поживних речовин із їжі та регуляція імунної відповіді слизової. Порушення складу мікрофлори цього біотопу призводить до розвитку патологічних станів. Ці умови чітко відрізняють біотопи тонкої й товстої кишки. Аналіз досліджень показав, що в тонкій кишці переважають роди *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* і *Bacteroides*.

Мікрофлора тонкої кишки менш різноманітна ніж товстої, характеризується індивідуальними особливостями, динамічними змінами в часових вимірах. Методами геноідентифікації виявлено 160 ізолятів *Streptococcus* та 37 ізолятів *Veillonella*. Порушення складу мікрофлори цього

біотопу веде до розвитку патологічних станів, а це потребує подальших досліджень у цьому напрямку.

Товста кишка характеризується, насамперед анаеробними умовами. Через це в цьому біотопі переважають анаеробні та факультативно анаеробні бактерії класу Firmicutes (кlostридії, бацили, грампозитивні коки) та родів Bacteroides [76, 105, 141].

Вікові особливості мікробіому

Мікробіота починає формуватися відразу після народження, переважно внаслідок передачі від матері, а до двох-трьох років вона за видовим та кількісним складом відповідає мікробіоті дорослого [167]. Передача від матері оптимальної мікробіоти під час природних пологів і в перші дні життя є основою формування належної мікробіоти, котра має значення протягом усього життя. Перші роки життя є критичним періодом для формування оптимальної мікрофлори [87]. У цей період формується альфа-різноманітність мікрофлори, тобто кількість окремих складових мікробіому, а також бета-різноманітність, тобто альтерації в окремих складових мікробіому. Вказується, що ця різноманітність має значення у фізичному та психоневрологічному розвитку дитини [166]. На сьогодні день найважливішим фактором, що веде до порушень мікробіоти дитини є вживання антибіотиків у ранньому віці, а ці зміни можуть мати значення протягом усього життя [124, 125, 249]. Відхилення бактеріальних спільнот від оптимального стану (стан дисбіозу) асоціюється з інфекційними та хронічними захворюваннями, включаючи некротичний ентероколіт, ентеропатію, ентерит, недоїдання, затримка розвитку, метаболічні порушення (метаболічний синдром, ожиріння, діабет другого типу) та atopічні захворювання, включаючи алергію та астму [2, 42, 188]. Важливим фактором, що впливає на формування мікробіоти у немовлят, є відповідність харчового раціону потребам організму дитини. При сильному недоїданні відзначається порушення альфа-різноманіття, зменшення кількості видів – продуцентів

бутирату та строгих анаеробів. Натомість збільшується кількість патогенних та умовно-патогенних видів [41, 232, 234].

Протягом життя мікрофлора ШКТ істотно змінюється залежно від дієти, впливу екологічних умов, проживання, шкідливих звичок. Виявлено зміни мікрофлори у людей зрілого і похилого віку, пов'язані з курінням та серцево-судинними захворюваннями. У курців зменшується кількість *Bifidobacterium*, тоді як кількість деяких грамнегативних бактерій *Burkholderia*, *Sutterella* та *Megamonas* зростає. При розвитку хронічних запальних процесів змінюється мікробне різноманіття та видовий склад мікробіоти. Встановлено кореляцію між складом мікрофлори, супутніми захворюваннями та когнітивними можливостями у людей похилого віку. Вказується на потребу досліджень, спрямованих на кореляцію мікробіоти в осіб похилого віку [157, 266].

Регіональні особливості мікробіому

При дослідженні регіональних особливостей кишкової мікробіоти встановлена чіткі відмінності у різних географічних регіонах як в окремих осіб, так і в регіоні в цілому [51]. Основним фактором, що впливає на стан мікробіоти у різних географічних регіонах є особливості харчування (дієта), але такий вплив значно залежить від початкового складу мікробіоти [106]. Дослідження мікробіоти в регіонах з різним етнічним складом показали, що мікробіоти проявляли певну стабільність властиву конкретному етносу, яка утримувалась і в наступних поколіннях. Це пояснювалось впливом традицій харчової та побутової поведінки. Мета-аналіз досліджень у цьому напрямку в Малазі показав спільні характеристики мікробіому етнічних груп, проте ці відмінності між групами не були достатньо чіткими. Загальний висновок цього мета-аналізу полягає в тому, що властиві певному етносу побутово-культурні традиції та соціально-економічні особливості впливають на склад мікробіоти [57]. Концепція, в якій мікробіом людини розглядається як особлива мікроекосистема, компоненти якої перебувають у постійному динамічному зв'язку із довкіллям та умовами діяльності людини. У цьому напрямку проведено ряд досліджень, у

яких вивчались особливості мікробіому людини в максимально природних умовах і зміни мікробіоти при цивілізаційних процесах та урбанізації. «Точкою відліку» такого напрямку досліджень можна вважати роботу, в якій показано результати досліджень мікробіоти груп людей, котра належить до «неконтактних племен» Південної Америки [46]. Автори вказують, що мікробіом цих людей характеризується найбільшою різноманітністю складу видів та геномів мікроорганізмів порівняно з усіма проведеними до того часу дослідженнями. При цьому в таких геномах виявлено гени резистентності до антибіотиків, навіть синтетичних, хоча досліджувані ніколи не контактували з цими препаратами. Подібне дослідження проведено зі своєрідними «контрольними групами» жителів Гімалаїв [103].

Автори досліджували мікробіом людей, які перебували на різних стадіях переходу до теперішнього способу життя. Першу групу становили особи з племені, в якому люди дотримувались способу життя «збирачів-мисливців». Друга група перейшла до сільськогосподарських робіт 200-400 років тому, та третя – особи, котрі жили 20-40 років тому. Мікробіоми групи «збирачів-мисливців» значно відрізнялися від інших досліджуваних груп, але були близькі до мікробіомів в тих групах, котрі вели подібний спосіб життя на інших континентах. В інших групах зміни мікробіомів наступали протягом одного покоління. Проте альфа -різноманітність в різних групах значно не відрізнялась, При порівнянні складу мікробіомів сільських і міських мешканців Танзанії виявлено суттєві відмінності. У сільських жителів переважали *Bacteroidetes*, зокрема *Prevotella copri*. Такий склад мікробіому спричиняв виражений імуномодуляційний вплив, зокрема на продукцію TNF- α та IFN- γ , опосередковану *Bifidobacterium longum* та *Akkermansia muciniphila* [231].

Мікробне різноманіття значною мірою залежить від факторів урбанізації і також опосередковується через харчування. В індустріалізованих суспільствах зменшується кількість мікроорганізмів родин й родів бактерій *Desulfovibrio*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Treponema*, *Oxalobacter*, *Paraprevotellaceae*,

Spirochaetae, Succinivibrionaceae зменшуються або зникають, тоді як частіше виявляються *Akkermansia muciniphila* [185, 227].

У дослідженнях останніх років обґрунтовується концепція One Health – «єдине здоров'я», яка розглядає мікробіоту та генетичні елементи людини та тварин, а також зовнішнього середовища як єдине ціле, а організм людини в такому середовищі як голобїонт – систему, що включає організм людини, мікрофлору тварин і зовнішнього середовища [253, 281]. Концепція One Health спрямована на виявлення, дослідження та попередження появи нових патогенів - зоонозів чи антропозоонозів, котрі передаються від тварин до людей і навпаки [208]. Виявлено подібність мікробіоти людей – працівників тваринницьких ферм та тварин [127,128].

Подібну схожість виявлено і щодо домашніх собак і членів родини [226]. При цьому існують ризики, що елементи мікробіоти спільні для людей та тварин можуть спричиняти захворювання у клінічній чи субклінічній формах [143]. Однак є повідомлення, що діти які живуть поблизу ферми мають менший ризик розвитку бронхіальної астми порівняно з дітьми в урбанізованому суспільстві [53,118].

До основних факторів, які досліджуються в системі One Health є антибіотикорезистентність мікроорганізмів (АБР). Гени резистентності передаються мікроорганізмами, в результаті чого в усьому світі зростає кількість мультирезистентних варіантів мікроорганізмів через надмірне використання антибіотиків у медицині, ветеринарії, аграрних біотехнологіях. При цьому біотоп кишкового каналу є найкращим місцем для обміну генами резистентності між резидентною та транзиторною мікрофлорою [242, 256].

1.5 Вплив мікробіоти на фізіологічні та патологічні процеси в організмі

Широкі дослідження кишкової мікрофлори дали підставу для формування концепції про її значення як особливого органу у людини та тварин. Як і будь-який орган, кишковий мікробіом виконує певні функції, необхідні для всього

організму. Порушення цих функцій може призвести до розвитку ряду патофізіологічних процесів, які, в кінцевому етапі, можуть спричинити патологічні зміни. У дослідженнях останнього десятиліття активно вивчається механізм дії кишкової мікробіоти як в біотопі кишкового каналу, так і її вплив на організм-господар у цілому, як у тварин, так і у людини [69, 92, 213].

Взаємодія кишкової мікробіоти з фізіологічними процесами в організмі є складним механізмом, що визначається наявністю та взаємодією різноманітних мікроорганізмів. Коменсали, які складають основну частину мікробіоти, виконують важливу роль у підтримці фізіологічного гомеостазу. Їхні функції включають участь у процесах перетравлення та всмоктування поживних речовин, синтезі вітамінів, а також захист від колонізації патогенними мікроорганізмами. Патобіонти (збудники кишкових інфекцій, які поступають із зовні), можуть викликати розвиток кишкових інфекцій і представляти певний ризик для організму. Їхній вплив зумовлений не лише їхньою кількістю, але і взаємодією з іншими складовими мікробіоти. Наприклад, антагоністична дія коменсалів може відіграти ключову роль у стримуванні розмноження та поширення патогенних мікроорганізмів [43]. Умовно-патогенні мікроорганізми, які в нормальних умовах не завдають шкоди, можуть стати причиною серйозних інфекцій при ослабленні імунної системи. Це особливо актуально для людей з порушеннями імунітету, де можливість розвитку бактеріємії та сепсису збільшується [230].

Однією з ключових проблем, пов'язаних із кишковою мікробіотою, є селекція антибіотикорезистентних мікроорганізмів. Використання антибіотиків може призвести до змін в складі мікробіоти та виникнення штамів, стійких до лікування. Вивчення цих процесів не тільки розкриває складність взаємодії мікробіоти із фізіологічними процесами, але і вказує на важливість збалансованого відношення між різними групами мікроорганізмів для збереження здоров'я організму (рис. 1.8) [43, 165, 219].

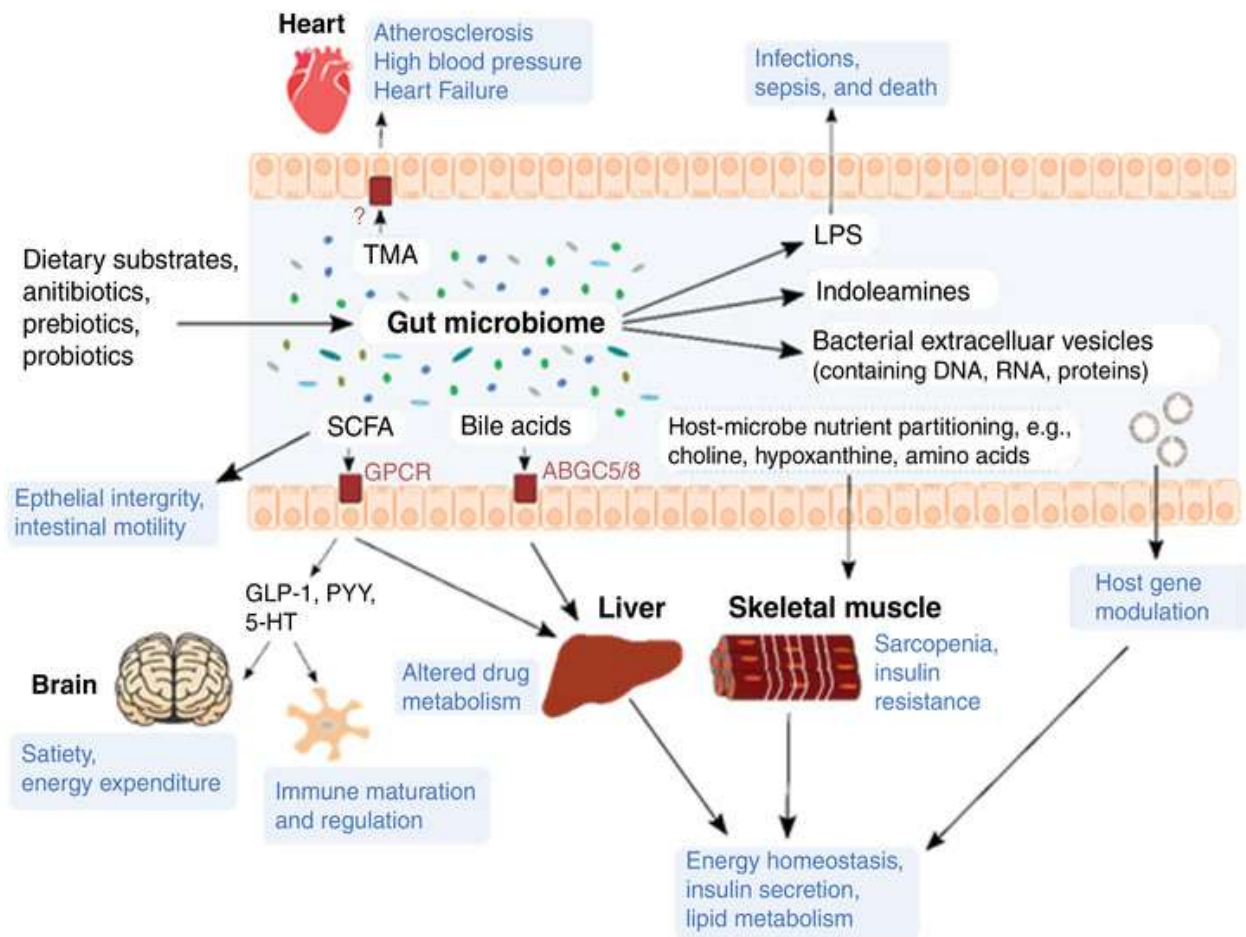


Рис. 1.8 Вплив кишкових мікробіомів на фізіологічні процесам в організмі людини [<http://surl.li/siqfp>].

Одним із ключових аспектів впливу мікробіоти на організм є її взаємодія з анатомічними структурами органів та фізіологічними процесами. Мікробні токсини, такі як ліпополісахариди, можуть викликати різні реакції в організмі, включно із впливом на імунну систему та запальні процеси. Шаблонні структури макромолекул, такі як патерни – ДНК, РНК, ЛПС, пептидоглікани, взаємодіють з різними клітинами організму, викликаючи відповідь імунної системи [109].

До найважливіших метаболітів мікробіоти належить триметиламін- N -оксид (ТМАО), котрий зараховують до найважливіших факторів розвитку атеросклерозу і серцево-судинних захворювань [18, 146, 278]. Взаємодія цього метаболіту з організмом може мати серйозні наслідки для здоров'я серця та судин. Також варто відзначити важливий вплив КЛЖК, які синтезуються мікробіотою. Ці кислоти можуть впливати на функції головного мозку і визначати когнітивні функції, концентрацію уваги та інші нейропсихічні

аспекти. У вивченні цих процесів важливу роль відіграє аналіз взаємодії мікробіоти з різними системами організму, а також врахування зовнішніх факторів, що можуть модифікувати ці взаємодії. Детальне розуміння цих механізмів є ключовим для розвитку нових підходів до підтримки здоров'я та лікування різних захворювань [18, 38]. З іншого боку, організм діє на мікробіоту та обмежує її впливи завдяки перистальтиці, слизу та мікрворсинкам слизових, клітинним бар'єрам, дії жовчних кислот. Клітини слизової оболонки кишки є продуцентами секреторних IgA які є фактором імунного захисту. До загальних механізмів захисту належить запалення, як може активуватися або пригнічуватися залежно від складу мікробіомів. Активація загальних неспецифічних реакцій вродженого імунітету розвивається внаслідок розпізнавання мікробних патернів TLR-рецепторами або іншими подібними рецепторами. До зовнішніх впливів на мікробіоту, належать фактори дієти та дія антимікробних препаратів, насамперед антибіотиків [190]. Підсумовуючи результати дискусій на симпозіумі у 2022 р., автори роблять такі висновки: мікробіота кишкового каналу, формуючись до трьох річного віку, може піддаватися змінам складу та функції й сприяти розвитку захворювань протягом усього життя. На сьогоднішній день окремі представники мікроорганізмів ШКТ та одержані на їх основі препарати можуть бути використані при лікуванні деяких захворювань, хоча склад «здорового мікробіому» наразі точно не встановлений. Існує потреба у вивченні впливу мікробних метаболітів, зокрема ТМАО, на розвиток атеросклерозу, серцево-судинних та інших ускладнень захворювань. Підвищена продукція ТМАО є показником несприятливих для організму змін мікробіому. Мікробіом може підтримувати розвиток патогенів, синтезуючи необхідні для них метаболіти, а також може передавати патогенам та патобіонтам гени резистентності до антибіотиків. Необхідне вивчення мікробіомів на основі прямого відбору матеріалу із ШКТ, оскільки фекальний мікробіом відрізняється від складу пристінкової мікрофлори [18, 219].

Ревматоїдний артрит (РА) є довготривалим автоімунним захворюванням, що переважно впливає на суглоби. Вважається, що мікробна інфекція відіграє

ключову роль у розвитку РА. Зміни у складі мікроорганізмів кишкового тракту у людей з доклінічним і вже встановленим РА свідчать про важливу роль кишкової мікробіоти в регуляції імунної дисфункції, яка є характерною для цього захворювання [274]. Автори [206, 243] вважають, що колонізація таких бактерій як *Bacteroides fragilis* пов'язана з посиленою активністю регуляторних Т-клітин, які можуть полегшити перебіг РА. Склад кишкової мікробіоти може змінювати рівень статевих гормонів, впливаючи на виникнення РА. Дефіцит статевих гормонів підвищує кишкову проникність, тим самим збільшуючи кількість клітин Th17 у периферичній крові та рівні остеокластогенних цитокінів RANKL, IL-17 і TNF- α , сприяючи резорбції кісток. А такі бактерії як *Clostridium* можуть виробляти ферменти, які каталізують перетворення глюкокортикоїдів в андрогени, надаючи імуномодуючу дію [203]. Дослідники [102, 259] стверджують, що *Bifidobacterium longum* може значно знизити захворюваність на ревматоїдний артрит, артрит і пошкодження кісток шляхом пригнічення вироблення IL-17 та інших прозапальних медіаторів.

У рукописі [159] іде мова про те, що дисбактеріоз кишківника передують артриту, а місцеве запалення кишківника призводить до системного запалення у генетично схильних осіб. Однак точний механізм, за допомогою якого мікроорганізми провокують імунну відповідь у дистальних ділянках, ще належить з'ясувати. Незважаючи на те, що характерний мікробіом РА не був ідентифікований, у дослідженнях були виявлені деякі спільні висновки, що надлишок *Prevotella copri* присутній у пацієнтів на ранній стадії РА та збільшення мікроорганізмів роду *Collinsela* та деяких видів *Lactobacillus* характерно для хронічного РА.

З метою корекції та відновлення кишкової мікробіоти використовують певні стратегії. До таких стратегій належить використання препаратів на основі живих культур мікроорганізмів [93, 158, 252, 280]. Препарати пробіотики містять певні види бактерій, властиві оптимальним мікробіомам. Пребіотики містять речовини, що сприяють розмноженню пробіотиків, насамперед харчові волокна. Препарати-постбіотики — містять продукти метаболізму мікрофлори, зокрема

коротколанцюгові жирні кислоти [78]. Інші стратегії полягають у застосуванні бактеріофагів та бактеріоцинів [49, 55, 150].

Одним із перспективних напрямків корекції та відновлення мікробіому є трансплантація мікробіоти від донорів, що виявилася ефективною у лікуванні некротичних ентеритів, спричинених *Clostridium difficile* [94].

Перевірено, що успішне використання пробіотиків залежить від наявності певної початкової мікрофлори в кишківнику пацієнта. У ролі пробіотиків застосовуються бактерії родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, а також деякі варіанти *E. coli* та *Bacillus*, а також дріжджові гриби *Saccharomyces cerevisiae*. Зокрема, до нового покоління пробіотиків належать *Akkermansia muciniphila* та компоненти клітин цих бактерій [182, 220, 229].

Ще однією інноваційною тенденцією є розробка генетично модифікованих мікроорганізмів, що мають необхідні властивості. Тут використовують технології CRISPR-Cas9, які дозволяють точно змінювати генетичний матеріал для досягнення конкретних характеристик мікроорганізмів. Ці напрямки досліджень показують перспективи у вдосконаленні методів лікування захворювань, пов'язаних з дисбалансом мікробіоти кишечника, відкриваючи нові можливості для оптимізації здоров'я пацієнтів [56, 171, 267]. До напрямків корекції змін, що розвиваються при дисбіозах відносять коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК).

Бактерії—продуценти КЛЖК

До ключових регуляторних впливів КЛЖК належить їхній динамічний вплив як модуляторів імунної системи кишкового тракту та організму в цілому. КЛЖК виникають в результаті ферментативного розщеплення нерозчинних вуглеводів мікробіотою кишечника. Вони взаємодіють з різними клітинами імунної системи, виконуючи роль сигнальних молекул. Ці жирні кислоти можуть модулювати різні аспекти імунної відповіді, включаючи запалення, диференціацію та функціональність імунних клітин [27, 216]. Вони сприяють підтримці імунологічного гомеостазу та захисту організму від патогенних впливів. КЛЖК також можуть впливати на продукцію протизапальних цитокінів

та регулювати активність імунних клітин. Ця взаємодія є важливою для підтримання імунологічної стійкості та запобігання захворюванням, пов'язаним з порушенням функції імунної системи кишкового тракту. Розуміння динамічної ролі КЛЖК як модуляторів імунітету відіграє важливу роль у розвитку стратегій лікування та підтримки імунітету, особливо в контексті захворювань, пов'язаних з дисбалансом мікробіоти та імунної системи в кишковому тракті [177, 183, 198].

Кишковий мікробіом як динамічна система впливає на організм через комплекс сигнальних молекул, до яких належать КЛЖК. У кишковому каналі ці сполуки продукуються мікроорганізмами при метаболізмі харчових волокон. До КЛЖК, за критеріями Міжнародного союзу чистої та прикладної хімії (IUPAC), належать аліфатичні карбонові кислоти з менш ніж 6 атомами Карбону: - формиат (мурашина кислота C1), ацетат (оцтова кислота C2), пропіонат (пропіонова кислота C3), бутират (масляна кислота C4), валеріат (валеріанова та ізовалеріанова кислота C5). Кишкова мікрофлора у найбільшій кількості продукує ацетат, пропіонат та бутират. Пропіонова кислота зменшує синтез холестеролу в печінці та покращує метаболізм жирів, має протизапальні та антибактеріальні властивості, пригнічує патогенну мікрофлору, а також захищає кишечник людини від хвороботворних мікроорганізмів [160]. Масляну кислоту — бутират відносять до найважливіших за впливом КЛЖК, оскільки вона є джерелом енергії для колоноцитів, впливає на імунну модуляцію, клітинну диференціацію та зменшує окислювальний стрес, має протизапальні властивості [23].

Основні функції КЛЖК систематизовано в огляді [7, 8]. Утворюючись у кишковому каналі ссавців, птахів, гризунів при розщепленні харчових волокон мікроорганізмами, КЛЖК беруть участь у загальнофізіологічних процесах: травленні, метаболізмі лікарських препаратів, елімінації токсинів, регулюють функції нервової, ендокринної системи та імунної системи [69].

Основними продуцентами КЛЖК є види бактерій, що населяють кишковий канал, переважно товстий кишківник. Продуцентами бутирату вважаються *Ruminococcus bromii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium hallii* та

Eubacterium rectale, *Roseburia spp.*, *Anaerostipes spp.*, *Coprococcus comes*, *C. catus* і *C. eutactus* а також *Roseburia hominis* [114, 265].

При запальних процесах в кишківнику, склад мікрофлори змінюється в сторону зменшення кількості бактерій-продуцентів бутирату. Відмічено певні позитивні результати призначення бутирату з лікувальною метою [77, 138].

Важливим продуцентом пропіонату визнана бактерія *Akkermansia muciniphila* [104]. Автори вважають, що вказаний вид бактерій впливає на сигнальні канали системи кишківник-печінка-мозок й застосований з лікувальною метою для сільськогосподарських тварин у Лабораторії молекулярного харчування тварин Чжецзянського університету (КНР). На думку авторів, цей вид бактерій доцільно розглядати як пробіотик нового покоління із широким спектром дії, оскільки він має захисну роль щодо слизової оболонки кишечника завдяки продукції пропіонату, впливає на обмін вуглеводів завдяки контролю рівня глюкози в крові.

1.6 Вплив НПЗП на мікробіоту ШКТ

Широке використання НПЗП, пов'язане з їхньою протизапальною, анальгетичною, антипіретичною дією, зумовило побічні ефекти, насамперед щодо ШКТ. Крім того, відмічені порушення з боку серцево-судинної системи та нирок. Дія НПЗП по-різному проявляється у різних відділах ШКТ. Найбільш поширеними побічними ефектами цих препаратів у верхніх відділах ШКТ є утворення пептичних виразок, кровотечі та, як наслідок - перфорація стінки [195, 261, 269]. Але основним органом-мішенню для дії НПЗП, опосередкованим через мікробіом, є тонка й особливо клубова кишки. Така дія проявлялась ознаками запалення, підвищеної проникливості, виразками та кровотечами, а також порушеннями всмоктування. Такі порушення в клінічній практиці визначаються як ентеропатії. Вони важко піддавались діагностиці, оскільки поширені методи, включно з фіброгастроскопією і колоноскопією не давали можливості поставити діагноз, проте застосування капсульної та балонної ендоскопії створюють можливості точної діагностики [169, 262]. Ці методи дали можливість

встановити основні механізми пошкодження стінки кишки. Первинні ланки ушкоджень пов'язані з блокадою ЦОГ, причому селективна блокада ЦОГ-2 спричиняє менш виражену дію, ніж блокада ЦОГ-1. В результаті такої блокади порушується синтез простагландинів. Унаслідок порушення бар'єрної функції грамнегативні ентеробактерії можуть проникати у слизову і завдяки ліпополісахариду (ЛПС), взаємодіють з TOLL-подібним рецепторами розпізнавання мікробних партнерів. У результаті такого розпізнавання запускається каскад реакцій через експресію інтерлейкінів та інших цитокінів [40]. Нагромадження нейтрофілів у слизовій веде до цитотоксичної дії та утворення виразок. Важливий вплив на розвиток ентеропатії мають жовчні кислоти, що діють в кишково-печінковому колообігу. Зміни в мікробіоті, викликані застосуванням НПЗП, вносять певні модифікації у склад жовчі. Підвищення рівня гідрофобних вторинних жовчних кислот, спричинене цими препаратами, може сприяти ушкодженню тонкої кишки. Незважаючи на те, що відомо про вплив НПЗП на склад жовчі та можливий негативний вплив на тонку кишку, інформація щодо впливу цих препаратів на жовчні кислоти тонкої кишки є обмеженою. Особливо важливо розуміти, чи існує кореляція між змінами у складі жовчі та ураженням слизової оболонки кишечника, а також дисбактеріозом [139].

Вплив НПЗП залежить від хімічної структури препарату і вибіркості дії на ЦОГ. При дії аспірину збільшується кількість *Prevotella*, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* та *Barnesiella*, а при лікуванні целекоксибом та ібупрофеном наростає вміст *Acidaminococcaceae* та *Enterobacteriaceae* [108, 204]. Аналіз даних літератури вказує, що вплив НПЗП на склад мікробіоти кишечника людини може залежати від віку, статі, типу НПЗП, дієти, психологічного стресу тощо [79, 161]. До клінічно важливих форм порушень мікробіоти кишкового каналу належить надмірний бактеріальний ріст тонкої кишки (Small Intestinal Bacterial Overgrowth – SIBO). Цей синдром характеризується посиленням розмноженням бактерій у верхніх відділах кишкового каналу. При цьому в аспіраті з тонкої кишки кількість мікроорганізмів перевищує 10^6 КУО/мл. Неінвазивним методом

діагностики SIBO є дихальний тест з лактулозою, при якому у видихуваному повітрі виявляється підвищена кількість водню та метану. В роботі [61, 168] показано, що в осіб, котрі тривалий час вживали НПЗП зростає ризик розвитку SIBO.

Для діагностики порушень мікробіоти ШКТ використовують тест на визначення кальпротектину, як біомаркера кишкових розладів, особливо запальних захворювань шлунково-кишкового тракту [16].

На основі аналізу наведених даних наукових досліджень можна дійти до висновку, що кишкова мікробіота сприяє розвитку НПЗП ентеропатії, а взаємодія між НПЗП і мікробіотою не повністю з'ясована. Для вивчення процесів взаємодії мікробіоти та НПЗП використовують тварин-гнотобіотів (безмікробних тварин) [250], а також *in vitro* модель «дірявої кишки» - гіперпроникливості кишечника на основі культур клітин лінії Caco-2 [48]. Використовуючи модель (КК Caco-2), провели дослідження впливу НПЗП, таких як кетопрофен та ібупрофен, на біохімічні процеси в клітинах. Виявлено, що ці препарати мають специфічний ефект на запальні зміни у модельованому запальному процесі.

Висновки до розділу 1

Наведені в огляді літератури дані вказують на особливо важливу роль мікробіоти кишкового каналу у фізіологічних та патофізіологічних процесах організму, впливу НПЗП на взаємодію кишкового мікробіому з організмом та на потребу подальших досліджень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальне дослідження виконувалось впродовж 2020-2024 років у лабораторії клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН; лабораторіях кафедрах мікробіології та фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького, Експериментальному центрі Науково-дослідного інституту епідеміології та гігієни ЛНМУ імені Данила Галицького. Це дослідження було частково профінансоване Міністерством Охорони Здоров'я України «Дослідження протимікробної та протизапальної активностей гетероциклічних та сполук природнього походження» [грант номер: 0123U100153].

2.1 Характеристика предмету дослідження

Предметом дослідження є вивчення впливу новосинтезованої похідної 4-тіазолідинону в порівнянні з дією НПЗП (німесулід) та вплив сполуки на мікробіоценоз кишечника тварин на тлі змін з боку стану організму.

Характеристика хімічної сполуки похідної 4-тіазолідинону та досліджуваного препарату НПЗП

Синтез ряду похідних 4-тіазолідинонів було здійснено на кафедрі фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького під керівництвом професора Лесика Р.Б. Об'єктом дослідження була новосинтезована похідна 4-тіазолідинону (сполука Les-6490) як потенційна лікоподібна молекула та позитивний контроль НПЗП—препарат Німесулід.

Синтез хімічної сполуки

Температуру плавлення вимірювали капілярним методом за допомогою приладу BÜCHI B-545 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Швейцарія). Елементний аналіз (С, Н, N) проводили з використанням аналізатора Perkin-Elmer 2400 CHN (PerkinElmer, Waltham, MA, США), отримані значення знаходяться в межах $\pm 0,4\%$ від теоретичних значень. Спектри ЯМР ^1H (частота 500 МГц) і ^{13}C (частота 100 МГц) записували на спектрометрі Varian Unity Plus 500 (500 МГц) (Varian

Inc., Palo Alto, CA, США). Всі спектри записували при кімнатній температурі. Хімічні зсуви (δ) подаються у ppm, а константи спінової взаємодії (J) у Гц. Спектри LC-MS записували на спектрометрі Finnigan MAT INCOS-50 (Thermo Finnigan LLC, San Jose, CA, США). Перебіг реакції контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) за допомогою комерційних ТШХ-пластин (Merck Kieselgel 60 F254, Merck, Darmstadt, Німеччина). Розчинники та реагенти, які є комерційно доступні, використовували без додаткової очистки. Тіазолідиндіон-2,4 (i) та 1,3-діфеніл-1*H*-піразол-4-карбальдегід (ii) були синтезовані згідно з методикам, описаними в [15, 248] відповідно.

*Загальна процедура для синтезу 5-(1,3-діфеніл-1*H*-піразол-4-ілметилен)-2,4-тіазолідиндіону (сполука Les-6490):*

Суміш 0,01 моль тіазолідиндіону-2,4 (i), 0,011 моль 1,3-діфеніл-1*H*-піразол-4-карбальдегіду (ii) і 0,015 моль ацетату амонію нагрівали зі зворотнім холодильником в 20 мл толуолу протягом 5 годин. Отриманий жовтий кристалічний осад відфільтровували, промивали гексаном і перекристалізували з суміші DMF-етанол (1:2). Вихід: 85%, жовтий кристалічний порошок, т.п. 278-280 °C (DMF-EtOH (1:2)). LC-MS (ESI+): m/z 348,0 (100,0%, [M+H]⁺). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,40 (т, $J = 7,4$ Гц, 1H аром.), 7,47 – 7,59 (м, 6H, аром. + CH іліден), 7,63 (д, $J = 7,3$ Гц, 2H аром.), 8,00 (д, $J = 8,0$ Гц, 2H, аром.), 8,68 (с, 1H, CH, піразол), 12,52 (с, 1H, NH, тіазолідинон). ¹³C ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 115,9, 119,8, 122,5, 123,1, 127,9, 128,4, 129,2, 129,4, 130,1, 131,8, 154,1, 167,5 (C=O), 167,9 (C=O).

*Загальна процедура для синтезу 5-(1,3-діфеніл-1*H*-піразол-4-ілметилен)-2,4-тіазолідиндіону (сполука Les-6490):*

Суміш 0,01 моль тіазолідиндіону-2,4 (i), 0,011 моль 1,3-діфеніл-1*H*-піразол-4-карбальдегіду (ii) і 0,015 моль ацетату амонію нагрівали зі зворотнім холодильником в 20 мл толуолу протягом 5 годин. Отриманий жовтий кристалічний осад відфільтровували, промивали гексаном і перекристалізували з суміші DMF-етанол (1:2). Вихід: 85%, жовтий кристалічний порошок, т.п. 278-280 °C (DMF-EtOH (1:2)). LC-MS (ESI+): m/z 348,0 (100,0%, [M+H]⁺). ¹H ЯМР

(400 МГц, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,40 (т, *J* = 7,4 Гц, 1Н аром.), 7,47 – 7,59 (м, 6Н, аром. + СН іліден), 7,63 (д, *J* = 7,3 Гц, 2Н аром.), 8,00 (д, *J* = 8,0 Гц, 2Н, аром.), 8,68 (с, 1Н, СН, піразол), 12,52 (с, 1Н, NH, тiazолідинон). ¹³С ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 115,9, 119,8, 122,5, 123,1, 127,9, 128,4, 129,2, 129,4, 130,1, 131,8, 154,1, 167,5 (C=O), 167,9 (C=O) [120].

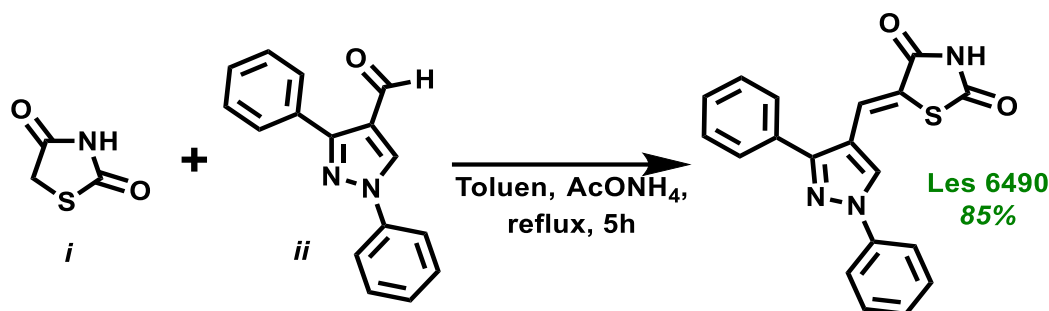


Рисунок 2.1 Схема синтезу 5-(1,3-дифеніл-1Н-піразол-4-ілметилен)-2,4-тіазолідиндіону (сполуки Les-6490).

Характеристика НПЗП

З групи НПЗП для дослідження ми обрали препарат Німесулід (виробник «Лекхім-Харків», Україна, реєстраційне посвідчення UA/6540/01/01 №1547 від 29.08.2022) [283].

Німесулід (Nimesulidum), N-(4-нітро-2-феноксифеніл) метансульфонамід, жовтуватий кристалічний порошок, практично нерозчинний у воді, легкокорозивний в ефірі, малорозчинний в етанолі. Тпл — 143–144,5 °С. Препарат який діє як інгібітор ферменту синтезу простагландинів циклооксигенази [284].

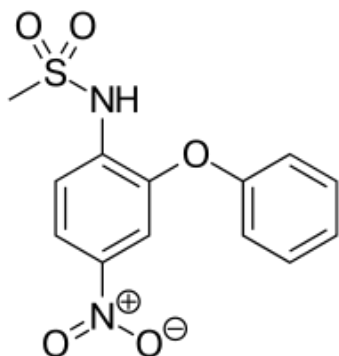
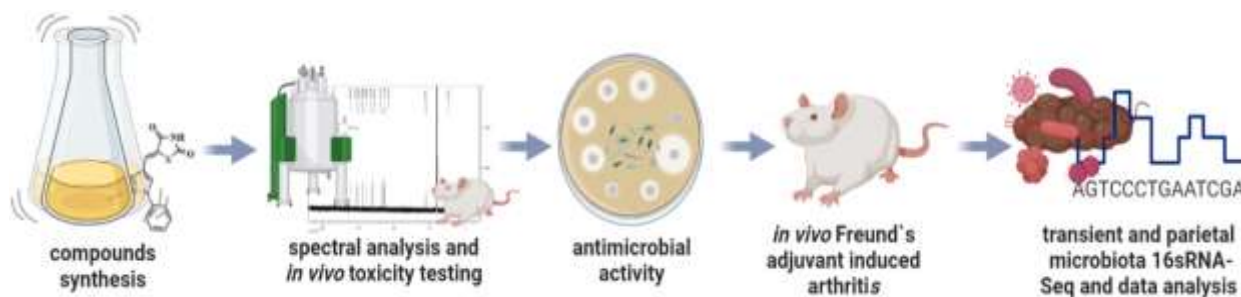


Рисунок 2.2 Хімічна формула німесуліду

Дизайн експериментального дослідження



Зроблено за допомогою додатка: <https://biorender.com>

ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ



Рис. 2.3 Схеми експериментального дослідження

2.3 Скринінг новосинтезованих сполук на протимікробну активність Визначення протимікробної та протигрибкової дії.

Протимікробну та протигрибкову дію *in vitro* визначали методом дифузії в агар (метод «колодязів») та методом серійних розведень (розщеплення резазурину в бульйоні), використовуючи референс-культури та клінічні штами мікроорганізмів з музею кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького. Референс-культури: *Pseudomonas saeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* №152, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Staphylococcus aureus* N 23, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Candida albicans* ATCC885/653; *Raoultella terrigena* ATCC 33257; клінічні ізоляти: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Raoultella terrigena*, *Staphylococcus lentus*, *Candida albicans* 67, *Lactobacillus fermentum* (пробиотичний штам), *Saccharomyces cerevisiae* N62, *Aeromonas hydrophila* N196.

Метод дифузії в агар передбачав внесення 100 мкл досліджуваної речовини у лунку діаметром $5,5 \pm 0,5$ мм, з попередньо нанесеною на пластинку агару (агар Мюллера-Хінтона та Сабуро) суспензію культури мікроорганізму (McFarland 0,5). Як контроль використали DMSO та протимікробні препарати, такі як ванкоміцин, ципрофлоксацин та клотримазол [65].

Метод серійних розведень (ResazurinReduction-BasedAssay) передбачав внесення в 96-лункову планшетку 50 мкл поживного середовища (бульйон Мюллера-Хінтона), 100 мкл досліджуваної речовини та 50 мкл суспензії мікроорганізму (0,5 McFarland), з додаванням 15 мкл 0,02% резазурину в кожен лунку. Робили серійні розведення. Планшетки поміщали у термостат на 24 год при температурі 37⁰ С - для бактерій та 25⁰ С - для грибків. Облік результатів проводили за зміною забарвлення у кожній лунці [63]. Дослідження проводили тричі.

2.4 Вивчення впливу сполуки Les-6490 на біоплівкоутворення

Дослідження проводили на стандартному плівкоутворюючому штамі *S. aureus subsp.* (ATCC 25923) та пробіотичному штамі *Limosilactobacillus fermentum*.

Біоплівки моделювали в полістеролових 96-лункових планшетах за методикою [44]. Готували інокулят добової культури штамів *S. aureus* та *L. Fermentum* в ізотонічному розчині до оптичної щільності 0,5 по Мак Фарленду (визначали за допомогою денситометра).

У лунки стерильного планшета (по три для кожного штаму) вносили 20 мкл суспензії бактерій, добавляли 180 мкл поживного середовища МПБ з глюкозою та вносили 50 мкл розчинену у ДСМО сполуку Les-6490 у концентрації 12,5 мкг/мл та 25 мкг/мл. Контролем слугувало середовище МПБ та ДСМО без мікробної суспензії. Планшет закривали кришкою та культивували 24 год при 37⁰С. Після культивування вміст кожної лунки видаляли та промивали буферним розчином (рН 7,2) для видалення неприкріплених мікроорганізмів. Після промивання, фіксували 200 мкл етанолом впродовж 15 хв. Утворенні плівки фарбували 2 % генціанвіолетом – 15 хв. Барвник, який не зв'язався з біоплівкою, видаляли триразовим промиванням планшета буферним розчином. Потім в кожну лунку вносили по 200 мкл 95 % етанолу для підтвердження зв'язування генціанвіолету з утвореною біоплівкою. Біоплівкоутворення оцінювали за допомогою спектрофотометричного аналізу на спектрофотометрі Mscroplate Photometr MPP-96.

2.5 Скринінг сполуки *in silico*.

Метод базується на використанні рецептор спрямованого методу віртуального скринінгу (*in silico*), призначеного для оцінки рівня і енергії зв'язування комплексу білок-ліганд, спрямованого на молекулярне розпізнавання між лігандом і білком-мішенню для вибору хімічних сполук, які максимально енергетично вигідно зв'язуються з активними центрами біологічно важливих мішеней (додаток 3).

2.6 Експериментальні тварини

Експериментальна робота була виконана на статевозрілих нелінійних білих щурах вихідною масою $180-220 \pm 5,1$ г, отриманих з віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Дослідження проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист лабораторних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи № 2010/63/ ЄС та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» зі змінами «440-ІХ від 14.01.2020», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013), положень Наказу МОН України №249 від 1.03.2012 р. «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» [285], відповідно протоколу № 10 від 20.12.2021 р. засідання комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів ЛНМУ імені Данила Галицького.

Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні для гризунів, з вільним доступом до води при сталій температурі повітря ($20 \pm 4^\circ\text{C}$) та вологості (50-60 %), і 12 годин світла/темряви цикл. Щурі були акліматизовані протягом 14 днів перед експериментами. Впродовж усього експерименту стежили за масою тіла, оцінювали зовнішній вигляд та загальний стан.

2.7 Визначення гострої токсичності похідної 4-тіазолідинону

До експерименту було залучено 18 самців мишей-альбіносів, вагою від 23 до 25 грам.

Визначення гострої токсичності: у дослідженні брали участь самці мишей-альбіносів, вагою від 23 до 25 грамів. Визначення гострої токсичної дії проводили у два етапи. Попередній (орієнтовний) етап, включав застосування широких інтервалів доз досліджуваної сполуки. На кожну дозу використовували по 3 тварин, яким вводили одноразово інтрагастрально розчинену у сольовому розчині (0,9% хлориду натрію) з невеликим додаванням полісорбату 80 (Tween-80[®]) новосинтезовану сполуку у дозах від 5000 до 10000 мг/кг. Перед введенням

сполуки тварин не годували впродовж 24 год. За результатами дослідження встановлювали максимально переносима та смертельна дози (ЛД₀ та ЛД₁₀₀).

Спостереження за лабораторними тваринами здійснювали упродовж 14 діб після введення досліджуваної сполуки. Враховували зовнішній вигляд та поведінку тварин, їх рухову активність, частоту дихання, прийом їжі та води. Реєстрували характер інтоксикації, її важкість та перебіг, оцінювали стан шерсті. Під час досліду відмічали загибель лабораторних тварин і, залежно від дози препарату, вираховували середню летальну дозу — ЛД₅₀.

При виборі дози під час вивчення гострої токсичності за умов інтрагастрального введення орієнтувались на максимальну дозу IV класу токсичності — 5000 мг/кг відповідно до методичних рекомендацій [287]. Розрахунок LD₅₀ проводили за допомогою статистичного методу Літчфілда–Вілкоксона [239].

2.8 Моделювання запального процесу

З метою індукування запального процесу, для вивчення протизапальної дії сполуки похідної 4-тіазолідинону, дослідним тваринам, вводили ад'ювант Фрейнда (АФ) (Thermo Fisher Scientific, США) підшкірно 0,1 мл в подошовну частину задньої кінцівки [176]. АФ містить в собі компоненти, такі як вакцина БЦЖ (*Bacillus Calmette-Guérin*) або полісахариди, отримані з мікобактерій туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis*), складні жирні кислоти (походження від ланоліну), олії та емульгатор у наступному співвідношенні: 10 мл ПАФ = 5 мл безводного ланоліну + 15 мл вазелінової олії + 50 мг вакцини БЦЖ, яку було знищено нагріванням. Використання АФ сприяє виникненню гіперчутливості уповільненого типу та розвитку аутоімунних процесів. Це призводить до ураження передусім різних суглобів задніх кінцівок, а також фалангові та плечові суглоби передніх кінцівок у щурів.

Розвиток запального процесу оцінювали в балах: 0 балів - відсутність еритеми набряку; 1 бал – легка еритема або набряк; 2 бали - помірний набряк та еритема від щиколотки до плюснової кістки; 3 бали – сильний набряк та еритема

від щиколотки до плюснової кістки; 4 бали – набряк, еритема, обмеження пасивної рухливості - неможливість зігнути щиколотку до гомілки.

Дослідження запалення проводили у трьох групах тварин по 6 особин – Група А – тваринам вводився ад'ювант у подушечку стопи задньої кінцівки (контроль), група AL – ад'ювант вводився на фоні введення сполуки Les-6490, група AN ад'ювант вводився на фоні введення німесулід.

Спостереження починались з першого дня з інтервалом у два дні до закінчення експерименту (14-ий день).

Окружність кінцівки в зоні максимального вираження запального процесу вимірювали за допомогою гнучкої лінійки з міліметровою шкалою.

2.9 Експериментальні групи

У дослідженні використано 60 щурів і сформовано 6 груп по 10 тварин (таб.1):

1 група (К) – контроль (інтактні тварини);

2-га група (L) – отримували сполуку Les-6490 (розчинену в Твін 80) в об'ємі 1 мл у дозі 10 мг/кг щоденно протягом 14 діб;

3-га група (N) – тваринам вводили німесулід (розчинений перед введенням у Твін 80) в об'ємі 1 мл у дозі 15 мг/кг щоденно протягом 14 днів;

4 -та група (A) – тваринам вводився ад'ювант у подушечку стопи задньої кінцівки (це група контролю з індукованим запаленням);

5 – та група (AL) – на фоні запального процесу, індукованого АФ, вводили сполуку Les-6490 в об'ємі 1 мл у дозі 10 мг/кг;

6- та група (AN) – на фоні запального процесу вводили німесулід (1 мл у дозі 15 мг/кг).

Німесулід та сполуку Les-6490 вводили тваринам внутрішньошлунково за допомогою нетравматичного зонда щоденно впродовж 14 днів.

Таблиця 2.1

Назва групи		Опис групи у досліді	Кількість щурів в експерименті (n)
Без АФ	K	Котрольні (інтактні тварини)	10
	L	Досліджувані тварини без ад'ювантного запалення, тільки з сполукою Les-6490	10
	N	Досліджувані тварини без ад'ювантного запалення, тільки з німесулідом	10
АФ	A	Ад'ювант (A)	10
	AL	Ад'ювант (A) + сполука Les-6490 (L)	10
	AN	Ад'ювант (A) + Німесулід (N)	10

2.10 Характеристика методик дослідження

Фізичні дослідження крові

Для дослідження зразки крові після декапітації тварин забирали у пробірки з антикоагулянтом.

Для визначення ШОЕ (мм/год) використовували метод Панченкова. Кров розводили з цитратом натрію у співвідношенні 4:1 та поміщали на 1 год в капіляр Панченкова, який градуйований на 100 поділок. По закінченні часу визначали швидкість осідання еритроцитів за нанесеною на капіляр шкалою [257].

Кількість еритроцитів ($\times 10^{12}/\text{л}$), лейкоцитів ($\times 10^9/\text{л}$), вміст гемоглобіну (г/л), визначали на гематологічному аналізаторі Mythic18 (Cormay Diagnostics, Poland).

Морфологічні методи дослідження крові

Лейкоцитарну формулу рахували мікроскопічним методом. Мазок крові, пофарбований за Романовським-Гімзою, досліджували під мікроскоп з імерсійним об'єктивом, за збільшення $\times 90$, підраховуючи різні морфологічні типи клітини лейкоцитів (виводили лейкограму). Всього у мазку підраховували 100 клітин, що давало можливість підрахунку відносного складу (у %).

Кількість еритроцитів, лейкоцитів, вміст гемоглобіну на гематологічному аналізаторі Mythic18 (Cormay Diagnostics, Poland).

Біохімічні методи аналізу

Матеріалом для біохімічного дослідження слугувала сироватку крові. Для її одержання, кров відбирали у скляні пробірки та витримували при кімнатній температурі. Після відділення сироватки, пробірки центрифугували 15 хв при 3000 об/хв.

Визначення рівня креатиніну проводилося на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000 (Human; автоматичний тип) за допомогою біохімічного набору Creatinine liquicolor (10051) (Вісбаден, Німеччина). Вміст креатиніну виражався в $\mu\text{моль/л}$ (одиниці Міжнародної системи одиниць - СІ).

Визначення активності амінотрансфераз, лужної фосфатази, сечовини. Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ) та концентрації сечовини, у плазмі крові проводили за допомогою стандартних біохімічних наборів, виготовлених фірмою — LACHEMA (Чехія) на біохімічному аналізаторі «Humalyzer-2000». Активності ензимів виражали у мккат/л, концентрацію сечовини — у ммоль/л.

Визначення загального протеїну та альбуміну проводили на біохімічному аналізаторі «Humalyzer -2000» з використанням стандартних біохімічних наборів, виготовлених фірмою—LACHEMA (Чехія). Концентрацію виражали г/л.

Визначення концентрації холестеролу та триацилгліцеролів проводили на біохімічному аналізаторі «Humalyzer-2000» з використанням стандартних біохімічних наборів, виготовлених фірмою — LACHEMA (Чехія). Концентрацію ліпідів виражали мМ/л.

Визначення кількості кальцій-іонів та фосфору проводили на біохімічному аналізаторі «Humalizer2000» з використанням стандартних біохімічних наборів, виготовлених фірмою — LACHEMA (Чехія) та виражали в ОД/л

Бактеріологічний метод

Після виведення тварин з експерименту відбирався біоматеріал із проксимального відділу товстої кишки. Всі мікробіологічні маніпуляції проводили з дотриманням правил асептики та антисептики. Досліджуваний матеріал зважували, додавали 0,9 % NaCl у перерахунку на 10-кратне розведення, гомогенізували, отримували вихідну пробу 10^{-1} . З вихідної проби готували серію розведень до 10^{-10} . Виявлення основних груп життєздатних мікроорганізмів (КУО) проводили шляхом висіву відповідних розведень у чашки Петрі. Використовували спеціальні, диференціально-діагностичні середовища. Для культивування анаеробних мікроорганізмів (клостридій та бактероїдів, біфідобактерій) застосовували систему GENbox (BioMerius, France). Для культивування аеробних факультативно анаеробних бактерій використовували м'ясо-пептонний агар, жовтково-сольвий та кров'яний агар, середовище Ендо, а також середовище для лактобактерій – Блікфельда.

Кількість бактерій кожного виду визначали за числом колоніями на щільних середовищах при висіві не менше як з трьох розведень з наступним обчисленням середнього показника і кількості бактерій в 1 г у lg КУО/г визначали за формулою:

$$M=N \times 10^{n+1},$$

де M – кількість бактерій в 1 г; N – кількість колоній, яка виросла на чашці Петрі,

n – степінь розведення матеріалу.

Для ідентифікації бактерій застосовували біохімічну ідентифікацію за допомогою тест-систем «Enterotest 24» та «Nefermtest 24» (Lachema, Чехія).

Секвенування 16s рРНК

ДНК була виділена і секвенована компанією Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. (Пекін, Китай).

Виділення ДНК

Загальну ДНК геному зі зразків було виділено методом СТАВ/SDS. Концентрацію та чистоту ДНК контролювали на 1% агарозному гелі. Відповідно до концентрації, ДНК розбавляли до 1нг/мкл стерильною водою.

Ампліфікація РНК

Гени 16S рРНК/18SrРНК/ITS різних ділянок (16SV4/16SV3/16SV3-V4/16SV4-V5, 18S V4/18S V9, ITS1/ITS2, Arc V4) були ампліфіковані за допомогою специфічного праймера (наприклад, 16S V4: 515F-806R, 18S V4: 528F-706R, 18S V9: 1380F-1510R та ін.) зі штрих-кодом.

Полімеразна ланцюгова реакція

Змішали однаковий об'єм 1-кратного завантажувального буферу з продуктами ПЛР і провели електрофорез на 2% агарозному гелі. Потім суміш продуктів для ПЛР очистили за допомогою набору для екстракції гелю Qiagen (Qiagen, Німеччина).

Секвенування та аналіз.

Нуклеотидні послідовності були згенеровані за допомогою NEBNext®Ultra DNA Library PreKit for Illumina; Дотримуючись рекомендацій виробника, були додані індексні коди. Якість генерації оцінювали на флуорометрі Qubit® 2.0 (Thermo Scientific) та біоаналізаторі Agilent Bioanalyzer 2100 [37,59].

Аналіз операційних таксономічних одиниць (OTU)

Аналіз послідовностей проводився програмним забезпеченням Uparse (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) [58]. Послідовності з $\geq 97\%$ схожістю були віднесені до одних і тих же OTU. Репрезентативна послідовність для кожного OTU.

Анотація видів

Для кожної репрезентативної послідовності використовувалася база Green Gene Database (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) на основі алгоритму класифікатора RDP (версія 2.2.<http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) [260] для анотування таксономічної інформації.

Побудова філогенетичних зв'язків

З метою вивчення філогенетичного зв'язку різних *OTU* та відмінностей доміантних видів у різних зразках (групах) було проведено множинне вирівнювання послідовностей за допомогою програмного забезпечення MUSCLE (версія 3.8.31) [<http://www.drive5.com/muscle/>].

Нормалізація бази даних

Інформація про чисельність *OTU* нормувалася за допомогою стандарту порядкового номера, що відповідає вибірці з найменшою кількістю послідовностей.

Альфа-аналіз різноманіття

Альфа-різноманіття застосовується при аналізі складності видового різноманіття для вибірки за 6 індексами, включаючи спостережувані види, Chao1, Шеннона, Сімпсона, ACE та Good-покриття. Всі ці індекси в наших вибірках були розраховані за допомогою QIIME (версія 1.7.0) і відображені за допомогою програмного забезпечення R (версія 2.15.3).

Бета-аналіз різноманіття

Для оцінки відмінностей вибірок у видовій складності використовували програмне забезпечення QIIME (версія 1.7.0). Кластерному аналізу передував аналіз головних компонентів (PCA), який був застосований для зменшення розмірності вихідних змінних за допомогою пакета FactoMineR та пакета ggplot2 у програмному забезпеченні R (версія 2.15.3). Аналіз головних координат (PCoA) був проведений для отримання головних координат і візуалізації складних, багатовимірних даних. Отримана раніше матриця відстаней зваженого або незваженого матеріалу серед отриманих раніше вибірок була перетворена в нову множину ортогональну вісь, за допомогою якої максимальний коефіцієнт варіації демонструється першою головною координатою, а другий

максимальний - другою головною координатою і так далі. Аналіз PCoA відображався пакетом WGCNA, пакетами stat та пакетом ggplot2 у програмному забезпеченні R (версія 2.15.3). Метод незалежних парних груп із середніми арифметичними (UPGMA) Кластеризація була виконана як різновид методу ієрархічної кластеризації для інтерпретації матриці відстаней з використанням середнього зв'язку та проводилася програмним забезпеченням QIIME (версія 1.7.0).

2.11 Статистичне опрацювання результатів дослідження

Статистичний аналіз показників проводили з використанням персонального комп'ютера і програмного забезпечення Microsoft Excel. Побудову графіків здійснювали за допомогою програми Excel відповідно до загальноприйнятих методик. У роботі наведено середні значення величин і стандартні похибки ($M \pm m$), які представлено в таблицях і на рисунках. Вірогідність відхилення значень обчислювали із використанням критерію Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності за $p < 0,05 - 0,001$. Кількість дослідів (n) відповідає кількості тварин, досліджених у кожному випадку.

Для статистичного метагеномного аналізу застосовували Вілксона (Mann-Whitney U) для порівняння двох незалежних вибірок. Він дозволяє визначити, чи є статистично значуща різниця між рангами елементів у двох групах та ANOVA, Tukey і Tukey HSD, застосовували у випадках аналізу декількох груп (більше двох) та для аналізу значущості різниці між групами.

РОЗДІЛ 3

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 АНТИМІКРОБНА ДІЯ ПОХІДНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНІВ

Вивчення та пошук нових хімічних сполук з потенційною протимікробною активністю є одним із пріоритетних стратегічних напрямків, рекомендованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) для боротьби з антибіотикорезистентністю.

Проведено скринінг 22 сполук похідних 4-тіазолідинонів методом дифузії в агар та методом серійних розведень (розщеплення резазурину в бульйон) [19, 65] (додаток 4). Найбільш активними щодо Грам (+) мікроорганізмів були піразоло[3,4-*b*]тіазоло[5,4-*e*]піридин-6-тіони 4.9, 4.10 та 5-ариліден-4-[(3-метил-1*H*-піразол-5-іл)аміно]-5*H*-тіазол-2-он 2.26 (МІК для *Streptococcus* 0,83 мМ), як щодо клінічного, так і щодо референтного штамів стафілококів (МІК для 4.9 та 4.10 0,79 мМ та 0,75 190 мМ, відповідно) [290].

В умовах експерименту вивчалась дія новосинтезованої сполуки, котра відноситься до похідних тіазолідинонів. Для синтезу похідної 4-тіазолідинону (сполука Les-6490) була застосована реакція Кньюенагеля в модифікації Жирара (рис. 3.1). Внаслідок взаємодії тіазолідин-2,4-діону (i) та 1,3-дифеніл-1*H*-піразол-4-карбальдегіду (ii) з застосуванням каталізатору безводного ацетату амонію в середовищі толуолу отримано цільову сполуку Les-6490 із задовільним виходом (85%) та ступенем чистоти [120] (рис. 3.1).

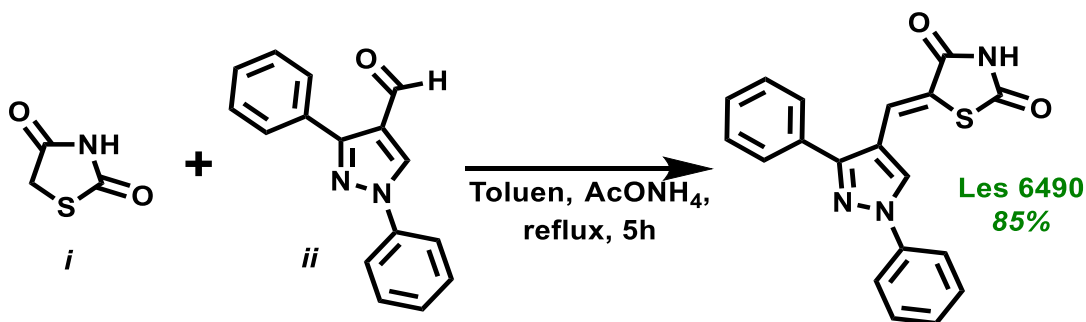


Рисунок 3.1 Схема синтезу 5-(1,3-дифеніл-1*H*-піразол-4-ілметилен)-2,4-тіазолідиндіону (сполуки Les-6490).

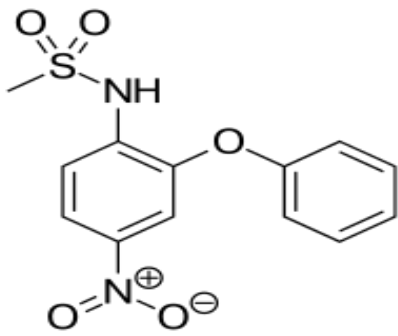


Рисунок 3.2 Хімічна формула німесуліді.

Мікробіологічні дослідження включали виявлення антимікробних властивостей сполуки Les-6490, а також дослідження впливу цієї сполуки та німесуліді на мікробіоценоз кишкового каналу щурів. Антимікробна дія Les-6490 вивчалась щодо представників грацілікутів (грамнегативних бактерій), фірмікутів (грампозитивних бактерій), а також грибів. Як тест-мікроорганізми досліджувались бактерії-грацілікути класу γ -протеобактерій, родини *Enterobacteriaceae* – стандартних штамів та клінічних ізолятів видів *Proteus vulgaris* №152 (стандартний штам), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (стандартний штам) *Klebsiella pneumoniae* (стандартний штам №43), *Klebsiella pneumoniae* 189 (клінічний штам). Одночасно досліджувався вплив Les-6490 на музейний штам *Raoultella terrigena*. ATCC 33257 – бактерій, що тепер перенесені з роду *Klebsiella* в окремий рід *Raoultella*; виділяються з води та ґрунту, але можуть спричиняти захворювання у людини, а також у лабораторних щурів. Як представник родини *Vibrionaceae*, рід *Aeromonas* досліджувався вплив *Aeromonas hydrophila* N196 (клінічний штам). Цей вид, як умовно патогенний, викликає широкий спектр інфекцій (септицемію, менінгіт, ендокардит) у людей, а також у гризунів, риб і земноводних. Досліджувався можливий вплив сполуки Les-6490 на бактерії – фірмікути. Як умовно-патогенний вид, викликає широкий спектр інфекцій (септицемію, менінгіт, ендокардит) у людей, а також у гризунів, риб і земноводних. Як на представників бактерій-фірмікутів класу *Bacillus* досліджувався можливий вплив сполуки Les-6490 на бактерії *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (стандартний штам), *Staphylococcus epidermidis* ATCC

12228 (стандартний штам), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (стандартний штам, резистентний до пеніцилінів), *Staphylococcus aureus* N 239 (клінічний штам), *Lactobacillus fermentum* (пробіотичний штам). Дію препарату досліджували на дріжджєвих грибах *Candida albicans* (ATCC 885-653) (стандартний штам), *Candida albicans* N679 (клінічний штам), *Saccharomyces cerevisiae* N62. Як препарати контролю використовувались такі: ванкоміцин (переважна дія на грампозитивні бактерії), ципрофлоксацин (широкий спектр дії), клотримазол – протигрибкова дія. Результати досліджень показані в табл. 3.1

Таблиця 3.1

Антимікробна активність сполуки Les-6490

№	Групи мікроорганізмів	Досліджувані види	Досліджувані препарати				
			Les-6490		Контрольні препарати (зона затримки росту, мм.)		
			ЗЗР	МІК μМ	Ванко міцин	ЦФЦ	КТЗ
	Грамнегативні бактерії	<i>Proteus vulgaris</i> №152	0	-	0	22.0 ± 0.3	-
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	0	-	0	35.0 ± 0.3	-
		<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257	0	-	0	42.0 ± 0.5	-
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	-	0	25.0 ± 0.4	-

		(музейний штам №43)					
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 189 (клінічний штам)	0	-	0	20.0 ± 0.2	-
		<i>Aeromonas hydrophila</i> N196 (клінічний штам)	0	-	0	27.0 ± 0.4	-
	Грампозитивні бактерії	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	0	-	32.0 ±0.5		-
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	11,2 ±0.2*	2020	30.0 ±0.5	30.0 ± 0.4	-
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.4 ±0.4*	2880	32.0 ±0.5	35.0 ± 0.5	-
		<i>Staphylococcus aureus</i> N 23	0	-	11.4 ±0.3	9.0 ± 0.2	-
		<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (пробіотичний штам)	0	-	-	43± 0.5	-
		Грибки	<i>Candida albicans</i> (ATCC 885-653)	20.0 ±0.4*	760	-	-

		<i>Candida albicans</i> N67	22.0 ±0.3*	790	-	-	700
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> N62	25.0 ±0.4*	820	-	-	МІК 820 µМ/л

Примітки: ЗЗР – зона затримки росту; ЦФЦ – ципрофлоксацин; КТЗ – клортимазол

Результати показані в табл. 3.1 вказують, що сполука Les-6490 не проявляла антимікробної дії на грамнегативні бактерії, котрі були чутливими до ципрофлоксацину, але стійкими до ванкоміцину. Водночас відмічена помірна активність сполуки щодо грампозитивних бактерій – *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (музейний штам), *S. aureus* ATCC 25923 (музейний штам). При цьому діаметр зони затримки росту становив $11,2 \pm 0,2$ мм і $15,4 \pm 0,4$ мм відповідно, тобто у 2,5 рази менше ніж у стандартних препаратів при досить значній МІК – 2020 і 2080 µМ/л. Клінічний ізолят *S. aureus* N 23, резистентний до пеніцилінів, одночасно був стійким до сполуки Les-6490, але чутливим до ванкоміцину та ципрофлоксацину. Таким чином, досліджувана сполука виявила певну, але обмежену активність проти грампозитивних бактерій. При дослідженні протигрибкової активності методом визначення МІК виявилось, що Les-6490 затримує ріст досліджуваних штамів грибів. Сполука затримувала ріст музейного штаму *C.albicans* (ATCC 885-653) – (МІК становила 760 µМ/л); *C. albicans* N67 (МІК становила – 790 µМ/л); *S. cerevisiae* N62 – 820 µМ/л, тоді як клортимазол затримував ріст цих штамів при близьких значеннях МІК -720, 700 і 820 µМ/л відповідно.

3.2 Вивчення впливу сполуки Les-6490 на біоплівкоутворення

Дослідження проводили на стандартному плівкоутворювальному штамі *S. aureus subsp.*(ATCC 25923) та пробіотичному штамі *Limosilactobacillus fermentum* (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив сполуки Les-6490 на біоплівкоутворення в одиницях щільності

Досліджуванні мікроорганізми	Контроль культури	Les-6490 (12,5 мкг/мл)	Les-6490 (25 мкг/мл)
<i>S. aureus</i>	0,258±0,001	0,254±0,002	0,256±0,001
<i>L. Fermentum</i>	0,206±0,002	0,208±0,001	0,211±0,002

При дослідженні впливу сполуки Les-6490 на біоплівкові форми клінічних штамів *S. aureus subsp.* та *L. Fermentum* не відмічалось статистично значущих змін оптичної щільності, хоча сполука проявила антимікробну дію щодо *S. aureus* (розділ 1).

3.3 Мікрофлора кишки у щурів під впливом німесуліді та сполуки Les- 6490 на фоні індукованого запалення

З метою одержання характеристик кишкового мікробіому щурів, котрі одержували препарат німесулід і сполуку Les-6490 на фоні індукованого запалення, проведено бактеріологічні дослідження. Для цього після виведення тварин з експерименту відбирався біоматеріал із визначеного біотопу товстої кишки і здійснювалися відповідні розведення, як описано в розділі «Матеріали і методи досліджень». Матеріал із останніх розведень засівався у чашки Петрі на середовища, які забезпечували ріст бактерій основних груп і давали змогу

оцінювати їхню кількість, морфотинкторіальні, культуромічні та біохімічні властивості (фото 3.1). Посіви здійснювались на середовища для анаеробів (кlostридій та бактероїдів) з наступним культивуванням в пакетах з анаеробними умовами. Для культивування аеробних факультативно анаеробних та аеротолерантних бактерій використовували МПА, кров'яний агар та середовище Ендо, а також середовище для лактобактерій. Кількість бактерій визначали за числом колоній на щільних середовищах при висіві не менше як з трьох розведень з наступним обчисленням середнього показника і кількості бактерій в 1 г у lg КУО/г. Для ідентифікації грамнегативних бактерій застосовували системи «Enterotest»-24.

Таблиця 3.3

Кишкова мікрофлора щурів при дії німесуліду та Les-6490 в умовах індукованого запалення

Мікроорганізми		Варіанти дослідів		
Класи	Родини, роди, види	Контроль	Німесулід	Les-6490
Грацілікути класу γ - протеобактерій		Кількість бактерій у lg КУО/г		
	Enterobacteriaceae <i>Eшеріхії</i>	4,1±0,25	3,5±0,20	3,5±0,20
	Інші ентеробактерії та γ - протеобактерії	9,1 ±0,2	7,0±0,82	6.2± 0.12
Фірмікути Клас Bacillia	<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	2,0±0,15	2,3±0,19	2,2 ±0,20

	<i>Enterococcus spp.</i>	5,0±0,2	6,2±0,3	6,4±1,13
	<i>Clostridium spp.</i>	4,0±0,12	5,0±0,14	5,4±0,20
	<i>Lactobacillus spp.</i>	6,2±0,3	5,7±0,2	3,4±0,2
Клас Actinobacteria	<i>Bidobacterium spp.</i>	8.4 ±0,3	7,1±0,2	10,8±0,6

Проведене бактеріологічне дослідження показало, що стан мікробіому кишкового біотопу щурів під впливом досліджуваних речовин змінювався.

У контрольній групі кількість грацілікүтів класу γ-протеобактерій становив 4,1±0,25 lg КУО/г (ешерихії) та 9,1±0,2 lg КУО/г (інші ентеробактерії та γ- протеобактерії). Кількість фірмікүтів класу *Bacillia* становила: 2,0±0,15 lg КУО/г (стафілококи); 5,0±0,2 lg КУО/г (ентерококи); 4,0±0,12lg КУО/г (кlostридії); 6,2±0,3 (лактобацили). Кількість біфідобактерій (клас *Actinobacteria*) становила 8,4±0,3 lg КУО/г. У групі тварин, які одержували німесулід виявлено зменшення кількості протеобактерій: вміст ешерихій становив 3,5±0, 20 lg КУО/г, інших протеобактерій – 7,0±0,82 lg КУО/г. У групі тварин, що одержували сполуку Les-6490 виявлено таку ж тенденцію: рівень протеобактерій становив відповідно 3,5±lg КУО/г і 6,2±0,12 lg КУО/г. Під впливом випробовуваних препаратів змінювались також кількісні показники бактерій класу *Bacillia*. У порівнянні з контрольною групою кількість ентерококів збільшувалась до рівня 6,2±0,3 lg КУО/г (німесулід) і 6,4±1,13 lg КУО/г (Les- 6490), бактерій роду *Clostridium* відповідно 5,0±0,14 lg КУО/г і 5,4±0,20 lg КУО/г. Кількість бактерій роду *Staphylococcus spp.* істотно не змінювалась.

Однак виявлено значне зменшення кількості лактобактерій. У групі тварин, що одержували німесулід, кількість цих бактерій становила $5,7 \pm 0,2$ lg КУО/г, а в групі під впливом сполуки Les-6490 зниження становило 1,8 раза порівняно з контролем ($3,4 \pm 0,2$ lg КУО/г). Проте виявлено значне зростання кількості бактерій класу Actinobacteria – біфідобактерій – до $10,8 \pm 0,6$ lg КУО в групі тварин, що одержували Les-6490 $10,8 \pm 0,6$ lg КУО, або в 1,3 раза більше, ніж в контрольній групі та в 1,4 раза більше ніж у групі, що одержувала німесулід. Тобто сполука Les-6490 сприяла зростанню кількості *Bifidobacterium*, яким властиво колонізувати кишковий тракт та відновлювати баланс кишкової мікробіоти. Проте для більш ґрунтовного дослідження дії цього препарату необхідно провести метагеномні дослідження, результати якого наведено у розділах 6-7.



Фото 3.1 Ріст бактерій на диференціально-діагностичних середовищах та лактобактерій на середовищі Блікфельда за дії сполуки Les-6490

Висновки до розділу 3

1. У досліджуваній сполуці Les-6490 виявлено активність проти грампозитивних мікроорганізмів, а саме – проти еталонного штаму *S. aureus* та клінічного штаму *S.cerevisiae* N62.
2. У результаті дослідження виявлено, що препарати німесулід та сполука Les- 6490 спричиняли зміни у мікробіоценозі кишкового біотопу щурів.

3. При дослідженні впливу сполуки Les-6490 на біоплівкові форми клінічних штамів *S. aureus subsp.* та *L. Fermentum* не помічено статистично значущих змін оптичної щільності.

4. Виявлено зниження кількості протеобактерій та лактобактерій при використанні німесулідю, а також збільшення кількості *Bifidobacterium* при використанні сполуки Les-6490, що вказує на потенційну здатність Les-6490 відновлювати баланс кишкової мікробіоти.

Результати вищезгаданих досліджень опубліковані у публікаціях [120, 288].

РОЗДІЛ 4

ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ КРОВІ ЩУРІВ. ТОКСИЧНІСТЬ СПОЛУКИ.

4.1 Гостра токсичність сполуки Les -6490 для мишей

Під час дослідження гострої токсичності новосинтезованої сполуки на мишах було встановлено середню смертельну дозу (ЛД₅₀). Перед введенням тваринам готували свіжий розчин сполуки та вводили внутрішньочеревно у зростаючих дозах від 100 до 1000 мг/кг. Для розрахунку ЛД₅₀ застосовано метод Літчфілда та Вілкоксона. Результати показали, що ЛД₅₀ сполуки для мишей, становить $910,0 \pm 57,0$ мг/кг, тобто є відносно мало токсичною в гострому досліді, що дає підставу віднести сполуку Les-6490 до 4-го класу токсичності [120, 290].

4.2 Дослідження гематологічних показників в умовах дії досліджуваних речовин при запальному процесі індукованому АФ

Умови експерименту та розподіл піддослідних тварин описані в розділі «Матеріали та методи». Гематологічні дослідження проводились на 14 день експерименту. У зразках крові визначали кількість еритроцитів, лейкоцитів, вміст гемоглобіну на гематологічному аналізаторі Mythic 18 (Cormay Diagnostics, Poland) та лейкограму рутинним методом мікроскопічного дослідження мазків, при диференціальному забарвленні за Романовським-Гімзою.

Статистичну обробку одержаних результатів проведено методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel 2003; 2013».

Результати дослідження показані у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Гематологічні параметри крові щурів за умов АФ-асоційованого запалення та дії препарату Les-6490 або німесулід, $M \pm m$, $n=10$

Показники	Групи експериментальних тварин					
	1	2	3	4	5	6
	К	N	L	A	AL	AN
Лейкоцити 10^9 /л	10,03±0,8	10,55±1,0	9,55±2,5	17,15±0,7	11,4±3,0	11,1±1,6*
Еритроцити, Т/л	8,7±0,32	8,6±0,42	8,4±0,7	6,11±0,3*	7,8±0,18*	7,12±0,67
Гемоглобін, г/л	137 ± 1,75	138,6±2,4	138,3±5,2	127,3±2,4	127,3±5,6	132,7±3,7
ШОЕ мм/годину	1,64 ± 0,5	2,10 ± 0,20	1,9 ± 0,18	4,36 ± 0,32	1,72±0,3*	1,8±0,4*

*Примітки до табл.1. Групи тварин : К- інтактні тварини, N– німесулід; L – Les-6490, AL– АФ+ Les-6490, А – АФ; AN– АФ + німесулід; * - групи з достовірними різницями показників ($p \leq 0,01$).*

Мета експерименту – порівняти дію препарату «Німесулід» і новосинтезованої сполуки Les-6490, похідної 4-тіазолідинону, на гематологічні показники (таблиця 4.1). Група 1 (К) – інтактні тварини; група 2 (N) – одержували німесулід; група 3 (L) – одержували сполуку Les-6490; група 4 (А) – тварини з індукованим ад’ювантом Фрейнда запаленням; тварини групи 5 (AL) одержували сполуку Les-6490 на фоні запального процесу; група 6 (AN) – німесулід + ад’ювант.

У групі контролю (К) кількість лейкоцитів становив $10,03 \pm 0,8 \times 10^9$ /л. При розвитку запального процесу, індукованого АФ (група А) рівень лейкоцитів підвищувався в 1,7 раза і становив $17,15 \pm 0,7^* \times 10^9$ /л ($p < 0,01$). У тварин групи L,

яким вводили сполуку Les-6490 рівень лейкоцитів становив $9,55 \pm 2,55 \times 10^9$ /л, тобто не відрізнявся від показників контрольної групи. Але в групі AL на фоні запального процесу Les-6490 спричинював зниження рівня лейкоцитів до $11,4 \pm 1,4 \times 10^9$ /л або в 1,6 разів нижче ніж у групі А, у якій тварини цю сполуку не одержували ($p < 0,01$). У групі N тваринам вводився німесулід, а в групі AN – німесулід на фоні запального процесу. Достовірної різниці кількості лейкоцитів між цими групами не виявлено: показники становили відповідно $10,55 \pm 1,0 \times 10^9$ /л і $11,1 \pm 1,6 \times 10^9$ /л. Проте відмічається достовірна різниця між показниками цих груп і групи А, в якій у тварин розвивався запальний процес після введення АФ ($p < 0,01$). Отже, сполука Les-6490 і німесулід спричиняють зниження кількісного рівня лейкоцитів, який підвищувався внаслідок запального процесу, спричиненого АФ. Результати показують, що досліджуванні сполуки не відрізнялись за дією на показник рівня лейкоцитів, який становив у групах AL і AN відповідно $11,4 \pm 1,4 \times 10^9$ і $11,1 \pm 1,6 \times 10^9$.

При дослідженні рівня еритроцитів виявлено, що цей показник у інтактних тварин група 1 (К) становив $8,7 \pm 0,32$ Т/л і виявився дещо вищим у тварин, які одержували Les-6490 або німесулід на фоні запального процесу – групи 5(AL) і 6(AN), показники $7,8 \pm 0,18$ Т/л і $7,12 \pm 0,67$ Т/л, зниження в 1,1 разів ($p = 0,01$) і 1,2 разів, ($p = 0,01$) відповідно. Найнижчим показник рівня еритроцитів виявлено в групі 4 (А) $6,11 \pm 1,4$ Т/л, у якій тварин не одержували протизапальних препаратів. В умовах запального процесу німесулід спричинював достовірне зниження загальної кількості еритроцитів.

Така ж тенденція виявлена і при дослідженні рівня гемоглобіну. У групі контролю рівень гемоглобіну становив $137 \pm 1,75$ г/л. Відмічена тенденція до зниження рівня гемоглобіну в групах тварин, у яких розвився запальний процес. Найнижчим цей показник виявлено у тварин групи 4 (А) $127,3 \pm 2,4$ г/л, групи 5 (AL) - $127,3 \pm 5,6$ г/л і групи 6 (AN) - $132,7 \pm 3,7$ г/л – але різниця між цими показниками і показниками у тварин інших груп недостовірна.

Самостійна дія німесуліду та Les-6490 суттєво не впливала на рівень лейкоцитів та ШОЕ у порівнянні із значеннями контрольних тварин, проте за

умови їх використання на тлі АФ-індукованого запалення кількість лейкоцитів знижувалась на 36,6 %, а за умов впливу сполуки Les-6490 – на 34,8% ($p < 0.01$). Також значення ШОЕ практично однаковою мірою знижувалось як в групі AN, так і в групі AL. Це може свідчити про те, що протизапальні властивості Les- 6490 не поступаються таким у німесуліді

У таблиці 4.2 наведені дослідження порівняльного впливу сполуки Les - 6490 і німесуліді на процентний вміст (ПВ) клітин лейкоцитарного ряду. Дія препаратів порівнювалась серед груп тварин, котрим не вводився АФ– групи 1(К), 2(L) та 3(N), і тими, у яких розвинувся індукований запальний процес (групи 4(A), 5(AL) та 6 (AN)).

Таблиця 4.2

Лейкоцитарна формула крові щурів за умов АФ-асоційованого запалення та дії препарату Les6490 або німесуліді, n=10, M±m

групи		Лейкоцитарна формула %				
		базофіли	еозинофіли	нейтрофіли	моноцити	лімфоцити
Без АФ	1(К)	0,5±0,2	3,5±0,83	25±3,2	6,8±0,31	64,2± 1,9
	2(L)	0,33±0,2*	3,0±0,89	16,8±5,6*	8,3±1,2	71,5±7,12
	3(N)	0,5±0,54	3,67±1,36	17,5±1,6*	9,2±0,76**	69,2±2,3
АФ	4(A)	0,3±0,51	3,0±0,89	38,7±3,38*	10,5±1,7	47,5±2,1**
	5(AL)	0,33±0,5	3,0±0,89	29,7±2,3	9,8±1,83	57,1±2,0**
	6 (AN)	0,5±0,54	2,7±1,2	32,3±6,1	10,8±2,7	53,7±4,2

Примітка * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$

У тварин, яким не вводився АФ одержані наступні результати: в інтактних тварин група 1(К) процентний вміст (ПВ) базофілів становив 0,5±0,2%, а при дії

сполуки Les-6490 група 2 (L) – $0,33 \pm 0,2\%$ ($p=0,05$), тобто виявлено зниження рівня базофілів, тоді як у групі 3(N) під дією німесулід змін ПВ базофілів не виявлено. Зміни рівня базофілів можна пояснити їх участю в біотрансформації ксенобіотків. ПВ еозинофілів у групах 2(L) та 3(N) не відрізнявся від рівня контролю. У інтактних тварин (група 1(K)) ПВ нейтрофілів становив $25 \pm 3,2\%$, а при дії сполуки Les-6490 знизився до $16,8 \pm 5,65$ (група 2(L), ($p=0,05$)).

Німесулід також спричинив зниження рівня нейтрофілів до $17,5 \pm 1,6\%$ (3 група N) ($p=0,05$). ПВ моноцитів у інтактних тварин становив $6,8 \pm 0,31\%$. У тварин групи 2(L), котрим вводився Les-6490 відмічено підвищення ПВ моноцитів до $8,3 \pm 1,2\%$, а в групі 3(N) — до $9,2 \pm 0,76\%$ ($p=0,01$). Також збільшувався ПВ лімфоцитів – у групі контролю — $9,2 \pm 0,76\%$, в групі, якій вводилася сполука Les-6490 — $71,5 \pm 7,12\%$, а в групі, що одержувала німесулід — $69,2 \pm 2,3\%$. Отже, обидва досліджувані препарати вплинули на показники лейкоцитарної формули у групах тварин, яким не вводився АФ – достовірно знизився ПВ нейтрофілів і проявилась тенденція до підвищення ПВ клітин агранулоцитарного ряду – моноцитів і лімфоцитів. Однак не відмічено різниці щодо дії цих препаратів на ПВ клітин лейкоцитарної формули.

При дослідженні дії сполуки Les-6490 і німесулід на ПВ клітин лейкоцитарної формули в умовах АФ-індукованого запалення виявлено наведені нижче результати. У групі тварин 4(A), яким не вводили протизапальні препарати (група внутрішнього контролю) виявлено тенденцію до зниження ПВ базофілів у порівнянні з інтактними тваринами. ПВ нейтрофілів у цій групі становив $38,7 \pm 3,38\%$, тобто в 1,6 раза вище ніж у контрольній групі ($p=0,05$). Певною особливістю показників ПВ клітин лейкоцитарної формули у групі (4A) є тенденція до збільшення ПВ моноцитів $-10,5 \pm 1,7\%$ - збільшення у 1,5 раза у порівнянні з інтактними тваринами ($p=0,05$). Але при цьому зменшився ПВ лімфоцитів до $47,5 \pm 2,1\%$ або в 1,4 раза відносно контролю ($p<0,001$). Такі зміни можна характеризувати як зсув лейкоцитарної формули вліво, що є типовим для запальних процесів. У групі 5(AL), яким вводили сполуку Les-6490, ПВ базофілів становив $0,33 \pm 0,5\%$, тобто виявляється тенденція до зниження ПВ цих клітин у

порівнянні з контролями. ПВ нейтрофілів у цій групі становив $29,7 \pm 2,3\%$ або у 1,3 раза нижче, ніж у групі внутрішнього контролю 4(A) ($p=0,01$). ПВ моноцитів під дією Les-6490 не змінився у порівнянні з групою внутрішнього контролю, а ПВ лімфоцитів становив $57,1 \pm 2,0\%$ або в 1,2 раза більшу ніж у групі внутрішнього контролю 4 (A), ($p < 0,001$). Отже, Les-6490 проявив протизапальні властивості в умовах запалення, індукованого ад'ювантом АФ.

Дію німесулід у умовах АФ – індукованого запалення також можна охарактеризувати як протизапальну. Це проявилось у зниженні ПВ нейтрофілів у групі 6 (AN) – $32,3 \pm 6,1\%$ порівняно з групою внутрішнього контролю, одночасно ПВ лімфоцитів проявив тенденцію до збільшення на 6%. Особливістю дії німесулід можна вважати тенденцію до зниження ПВ еозинофілів до $2,7 \pm 1,2$, яке не виявлялось ні в одній з досліджуваних груп тварин. Це може вказувати на протиалергійну дію препарату. Одержані результати показують, що в умовах АФ – індукованого запалення сполука Les -6490 проявляє протизапальну дію, яка чітко проявилась у зниженні кількості лейкоцитів та ПВ нейтрофілів. Проте достовірної різниці у дії цих речовин не виявлено, але німесулід спричиняв підвищення ПВ моноцитів у тварин, які не вводився АФ. Можна допустити, що це залежить від різних механізмів протизапальної дії порівнювальних препаратів, але це припущення потребує експериментального підтвердження.

4.3 Дослідження біохімічних показників сироватки крові тварин при дії німесулід та сполуки Les-6490 за умов експериментального запального процесу

Для оцінки змін з боку організму тварин і порівняння ефектів, спричинених німесулідом та сполукою Les-6490, за умов експериментального запального процесу досліджено низку біохімічних показників у сироватці крові піддослідних тварин: активність трансаміназ та лужної фосфатази (ЛФ), показники вміст загального протеїну та альбуміну, рівень креатиніну та сечовини, показники ліпідного обміну (загальний вміст холестеролу та тригліцеридів), кількісний рівень фосфору та іонів-кальцію як маркерів мінерального обміну. Дослідження сироватки крові проводили в біохімічній

лабораторії Інституту біології тварин НААН (біохімічний аналізатор Humalyzer 2000 (Human; автоматичний тип) .

Дослідження загального рівня білка, альбумінів, креатиніну та сечовини показано в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

Показники рівня протеїну, альбумінів, креатиніну і сечовини в умовах експерименту, n=10, M±m

Групи тварин		Біохімічні показники			
		Протеїн г/л	Альбумін г/л	Сечовина мМ/л	Креатинін мМ/л
Без АФ	1 К	77,75±6,57	27,02±2,69	4,57±0,39	90,3±7,34
	2 L	74,67±3,93	23,63±2,05	2,9±0,48*	92,9±5,29
	3 N	69,75±5,06	21,23±4,43**	3,83±0,17*	78,45±5,63
АФ	4 А	79,45±3,35	23,25±1,92	4,35±0,5	88,75±1,86
	5 AL	75,92±4,76	24,9±2,12	3,6±0,45	97,58±1,27**
	6 AN	75,42±4,67	18,95±0,89*	4,63±0,25	85,05±6,6

*Примітка *p≤0,05; ** p≤0,001*

Результати досліджень табл. 4.3 показали, що рівень протеїну у тварин, які не піддавались дії АФ у групі контролю К становив 77,75±6,57г/л, У групі L, якій вводилась сполука Les-6490, рівень протеїну – 74,67±3,93 г/л, а в групі N, які піддавались дії німесуліді – 69,75±5,06, проте зниження недостовірне.

При АФ – індукованому запальному процесі (група А) рівень білка істотно не відрізнявся від показника у інтактних тварин – 79,45±3,35 г/л і 77,75±6,57 г/л відповідно. У цих умовах сполука Les-6490 та німесулід не вплинули на рівень білка, вміст якого в групі AL становив 75,92±4,76 г/л, а в групі AN – 75,42±4,67 (різниця з групою А недостовірна).

При дослідженні вмісту альбуміну в сироватці крові тварин яким не вводився АФ наступні результати: в контрольній групі рівень альбуміну

становив 27,02 г/л, незначно знижуючись під дією сполуки Les-6490 (показник в групі L – 23,63±2,05 г/л), але під дією німесуліді (група N) знизився до 21,23±4,43 г/л, на 22,7% ($p < 0,001$).

При індукованому запальному процесі рівень альбуміну в групі A становив 23,25±1,92г/л. Сполука Les-6490 у групі AL не вплинув на рівень альбуміну, показник якого в цій групі дорівнював 24,9±2,12 г/л. Але під впливом німесуліді (група AN) рівень альбуміну знизився до 18,95±0,89 г/л ($p \leq 0,05$).

Концентрація сечовини у інтактних тварин (група K) дорівнювала 4,57±0,39 мМ/л. При введенні сполуки Les-6490 тваринам у яких не викликався запальний процес (група L) рівень сечовини знизився до 2,9±0,48 мМ/л або в 1,6 рази ($p < 0,01$). Можна припустити, що ця сполука, як ксенобіотик трансформується у печінці і впливає на орнітиновий цикл синтезу сечовини, але таке припущення потребує експериментального підтвердження. У тварин, яким вводився німесулід, рівень сечовини становив 3,83±0,17 мМ/л або 1,2 раза нижче, ніж контролі ($p < 0,01$). При індукованому запальному процесі (група A) рівень сечовини не підвищувався і становив 4,35±0,5 мМ/л. Сполука Les-6490 при введенні на фоні запального процесу (група AL) спричинила зниження рівня сечовини до 3,6±0,45 мМ /л, тобто перевищувало рівень групи L (в 1,2 раза) Німесулід в зазначених умовах експерименту (група N) істотно не впливав на рівень сечовини (4,63±0,25 мМ/л).

При дослідженні рівня креатиніну як показника функції нирок виявлено наступні результати: у інтактних тварин групи K концентрація креатиніну дорівнювала 90,3±7,34 мМ/л. Введення тваринам сполуки Les-6490, у яких не індукували запальний процес у групі L, не спричиняло змін рівня креатиніну у порівнянні з контролем. Але в таких умовах введення німесуліді спричинило зниження креатиніну до рівня 78,45±5,63 мМ/л, можливо внаслідок посиленого виділення цього ксенобіотика нирками.

На фоні розвитку запального процесу рівень креатиніну в групі A становив 88,75±1,86 мМ/л. Але введенні сполуки Les-6490 при запальному процесі (група AL) спричинила підвищення рівня креатиніну до 97,58±1,27 мМ/л або на 10%

($p < 0,001$). У цих же умовах експерименту при введенні німесуліді (група AN) рівень креатиніну не змінився.

Аналіз приведених результатів вказує, що індукований АФ запальний процес у щурів не призводив до змін концентрації білка, сечовини та креатиніну у порівнянні з інтактними тваринами. Рівень альбуміну у тварин із запальним процесом знизився в 1,3 раза. Досліджувані речовини спричиняли деякий вплив на біохімічні показники. Введення сполуки Les-6490 не спричиняло достовірних змін рівня білка, альбуміну та креатиніну.

Відмічено зниження рівня сечовини у сироватці крові у тварин при відсутності запального процесу на 63%. При дії німесуліді у тварин, яким не вводився АФ, рівень білка знизився на 10% ($p = 0,001$), а рівень альбуміну – на 30%, сечовини на 20 %.

Отже, відмічено більш виражений вплив німесуліді на досліджувані біохімічні показники, що відповідає застереженням, вказаним в офіційних інструкціях щодо вживання цього препарату з лікувальною метою.

Розуміння потенційної гепатотоксичності досліджуваних речовин, було проведено визначення активності маркерних ензимів функції гепатоцитів. Відомо, що тривале застосування німесуліді може призводити до порушення функцій гепатоцитів та супроводжується зростанням активності трансаміназ [26].

Результати досліджень показані в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Показники ензиматичних маркерів функцій гепатоцитів тварин за умови АФ-індукованого запалення та дії німесуліді і сполуки Les 6490, n=10, M±m

Групи тварин		Біохімічні показники			
		АлАТ од/л	АсАТ од/л	АсАТ \ АлАТ	ЛФ од/л
Без АФ	1 К	72,6±3,21	237±24,3	3,2	263±30,6
	2 L	52,9±8,7	217,1±24,1	4	169,85±12,83
	3 N	31,15±5,8	192,55±25,5*	6,1	233,8±45,52
АФ	4 А	57,9±7,2	180,1±33,5	3,1	235,05±22,27*
	5 AL	35,55±5,8	142,5±35,8*	4	250±13,51
	6 AN	35,59±4,1	110,1±4,6	3,1	312±35,8*

Примітка * $p < 0,001$

Результати досліджень, наведені в табл. 4.4 показують, що в групі інтактних тварин (К), АлАТ становив 72,6 од/л, але знижувався на 36,6% при введенні тваринам сполуки Les-6490 (група L). Ще більш істотним виявилось зниження АлАТ у групі тварин N, яким вводився німесулід рівень цього ферменту в цій групі становив 31,5±35,8 Од/ л або знизився на 67%. На фоні запального процесу в групі А вміст АлАТ дорівнював 57,9±7,2 Од/л або знижувався на 20%. У зазначених умовах Les-6490 (група AL), а також німесулід (група AN) знижували рівень АлАТ на 50% порівняно з групою К і на 40% порівняно з групою А. Подібні результати одержані також при дослідженні рівня АсАТ. У інтактних тварин рівень цього ферменту становив 237±24,3 од/л і значно знижувався під дією німесуліді – до 192±25,5 Од/л, зниження на 19% ($p < 0,001$). Тенденція до зниження АсАТ проявилась і при дії Les-6490 – зниження на 9% при ($p < 0,001$). При індукованому запаленні показники АсАТ також виявились нижчими порівняно з показникам відповідних груп щурів, у

яких запальний процес не індукувався. У групі А рівень АсАТ дорівнював $180 \pm 33,5$ або на 24% нижче ніж у інтактних тварин.

При дії сполуки Les-6490 проказних АсАТ становив $142 \pm 35,8$ або на 40 % нижче ніж у щурів контрольної групи і на 21% ніж у групі, яким препарат не вводився. Ще істотнішу дію спричиняв німесулід, рівень АсАТ у групі АН становив $110 \pm 4,6$ — на 54 % нижче ніж у інтактних тварин і на 39% нижче ніж у щурів, яким німесулід не вводився. Відповідні показники одержані при аналізі коефіцієнта де Рітіса — співвідношення АсАТ/АлАТ. Цей показник запропоновано для диференціації походження вказаних ферментів; підвищення коефіцієнта вказує на ураження серцевого м'яза. Проте, АсАТ і АлАТ міститься також і інших м'язах, відомо що коефіцієнт де Рітіса може змінюватися при фізичному навантаженні [32, 150]. У нашому експериментальному дослідженні виявлено зниження показників АсАТ і АлАТ при дії досліджуваних препаратів з протизапальною дією, особливо при введенні німесуліду. Можливо, що така дія німесуліду пов'язана з його протизапальною і анальгезивною дією на щурів, для яких умови експерименту спричиняли стресову ситуацію. При цьому німесулід міг проявити захисну дію впливаючи на кровообіг у печінці, секрецію та виділення жовчі, стан клітинних мембран, що й проявилось у зниженні рівня ферментів. З іншого боку, повідомлення про підвищення рівня печінкових ферментів при дії німесуліду стосуються ситуацій, коли проявлялась токсична дія препарату внаслідок перевищення одноразової, добової чи курсової дози або при індивідуальних особливостях пацієнта, що вказано офіційній інструкції до препарату як побічна дія, котра проявляється з невисокою частотою [284]. Сполука Les-6490 також проявила подібну дію, що вказує на перспективність його подальшого вивчення як протизапального препарату.

Фермент лужна фосфатаза (ЛФ), міститься у багатьох клітинах організму, зокрема в слизовій кишкового каналу, жовчевидільних шляхах і впливає на ліпідний та мінеральний обмін. У нашому експерименті виявлено зниження рівня ЛФ за дії сполуки Les-6490 при введенні щурам, у яких не викликався запальний процес (група L) у порівнянні з інтактними тваринами. Показники

цього ферменту становили відповідно $169,75 \pm 12,83$ Од/л і $263 \pm 30,06$ Од/л, зниження на 36% при $p=0,01$ і на 12 % знизився показник при дії німесулід у аналогічних умовах.

При введенні німесулід у щурам із запальним процесом рівень ЛФ становив $312 \pm 35,8$ Од/л перевищивши показники контрольних груп К і А групи інтактних тварини на 16 %. Отже, дія досліджуваних препаратів на показники лужної фосфатази різноспрямована, що можна пояснити їх впливом на різні біохімічні процеси з участю ЛФ.

У нашій роботі досліджено порівняльний вплив сполуки Les-6490 і препарату німесулід на показники ліпідного обміну. Гіполіпідемічні ефекти німесулід та інших селективних інгібіторів ЦОГ-2 були продемонстровані раніше [6]. Результати досліджень показані в табл. 4.5.

Встановлено, що рівень загального холестеролу в інтактних тварин становив $2,16 \pm 0,22$ мМ/л, але знижувався в усіх досліджуваних групах щурів. В умовах, коли в тварин не викликався запальний процес (група L) під дією сполуки Les-6490 рівень холестеролу знизився на 23 %, ($p < 0,001$). Німесулід у таких самих умовах експерименту знижував цей показник ліпідного обміну на 38% (група N). При запальному процесі (група A) рівень холестеролу дорівнював $1,42 \pm 0,12$ мМ/л (зниження у порівнянні з групою інтактних щурів на 40% ($p \leq 0,01$)). Німесулід при умовах запалення знижував рівень холестеролу на 43% (група AN). Досліджувані речовини спричиняли достовірне зниження рівня тригліцеридів. У контрольній групі показник тригліцеридів становив $1,6 \pm 0,37$ мМ/л, знижуючись на 37% під дією сполуки Les-6490 і на 51% під дією німесулід. В умовах запалення рівень тригліцеридів знижувався на 55%, а найбільше зниження виявлено у групі AL під дією сполуки Les-6490.

Аналізуючи вплив препаратів на показники ліпідного обміну, слід зазначити достовірне зниження рівня загального холестеролу і тригліцеридів, які спричинила дія як німесулід, так і сполука Les-6490, так і введення АФ в порівнянні з маркерами ліпідного обміну у тварин інтактною групи.

Показники ліпідного обміну тварин за умови АФ-індукованого запалення та дії німесуліді і препарату Les 6490, n=10, M±m

Групи тварин		Показники ліпідного обміну	
		Загальний холестерол мМ/л	Тригліцериди мМ/л
Без АФ	1 К	2,16±0,22	1,6±0,37
	2 L	1,64±0,35	1,02±0,21
	3 N	1,35±0,15*	0,79±0,18*
АФ	4 А	1,42±0,12	0,73±0,06
	5 AL	1,29±0,11	0,61±0,06
	6 AN	1,23±0,18	1,2±0,2**

Примітка * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

Водночас введення німесуліді та сполуки Les-6490 викликало ще більш виражене зниження вмісту холестеролу у сироватці щурів у групах AL і AN, тобто у тварин, в яких було індуковано запальний процес. Так, у тварин групи А на фоні запального процесу показник загального холестеролу становив $1,42 \pm 0,19$, у тварин групи за дії сполуки Les-6490 на тлі запального процесу – $1,29 \pm 0,11$ ммоль/л, а групи AN (за дії німесуліді) – $1,23 \pm 0,18$ ммоль/л.

Особливо вираженим є вплив сполуки Les-6490 на кількісний показник тригліцеридів, який знижувався до рівня $0,61 \pm 0,06$ ммоль/л, тобто на 16,4 % у порівнянні з групою тварин А з АФ-індукованим запальним процесом. У той час, як дія німесуліді супроводжувалася навпаки підвищенням кількості тригліцеридів до $1,2 \pm 0,2$ ммоль/л у порівнянні з показниками групи А, хоча цей показник був нижчим, ніж у щурів групи контролю (А). Нестероїдні протизапальні препарати як інгібітори ЦОГ та простагландинів впливають на мінеральний обмін, зокрема посилюють остеопороз [275].

Показники мінерального обміну в умовах експерименту

В умовах описаного вище експерименту досліджувався вміст показників мінерального обміну - визначення рівня неорганічних фосфатів та кальцій-іонів в сироватці крові.

Результати досліджень показані на рис 4.1.

Встановлено, що дія німесуліді супроводжується зниженням кількості неорганічних фосфатів від $3 \pm 0,14$ Од/л у контролі до $1,7 \pm 0,2$ Од/л, що становить 43% ($p < 0,001$) та кальцію в сироватці від $2,2 \pm 0,17$ до $1,7 \pm 0,2$ Од/л (23%) у той час, як сполука Les-6490 такого ефекту не виявляє. Проте на тлі АФ-запального процесу обидві досліджені речовини радше виявляють «нормалізуючий» ефект. Причому підвищення рівня кальцій-іонів у сироватці більшою мірою спричиняла сполука Les-6490. Така дія може вказувати на звільнення кальцію з кісткової тканини як ознаку остеопорозу.

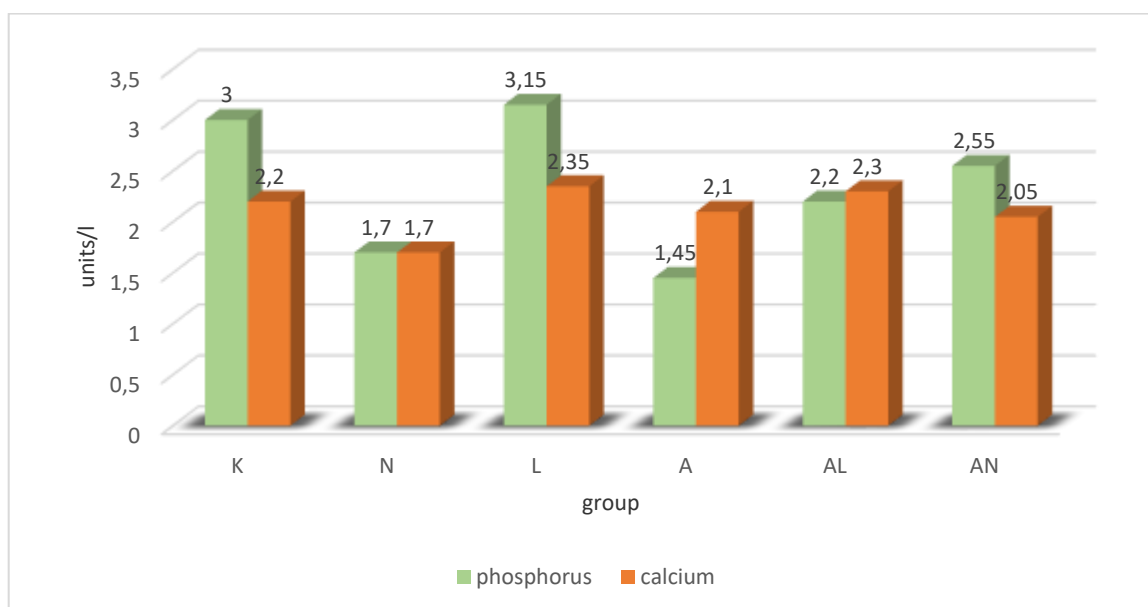


Рис.4.1. Показники фосфору та кальцій-іонів у сироватці крові щурів.

Таким чином ми провели порівняльний вплив селективного інгібітора ЦОГ-2 німесуліді та новосинтезованої сполуки Les-6490 на показники ліпідного

і фосфорно-кальцієвого обміну та визначено маркери гепатотоксичності як при самостійному введенні препаратів, так і при їх застосуванні на тлі АФ.

Висновки до розділу 4

1. Сполука має малу гостру токсичність для мишей, LD_{50} становить $910,0 \pm 57,0$ мг/кг.
2. Досліджувана сполука Les 6490 з хімічної групи похідних 4-тіазолідинонів за маркерами запального процесу (загальна кількість лейкоцитів та ШОЕ) не поступається рівнем протизапальної активності НПЗП німесулід.
3. Дослідження впливу сполуки Les-6490 на маркери захворювань печінки в порівнянні з дією німесулід не виявило суттєвої гепатотоксичної дії речовини, проте було зафіксовано зниження активності трансаміназ, найбільш виражене при застосуванні Les-6490 на тлі АФ.
4. Сполука Les-6490 проявляла гіполіпідемічний вплив як за умов самостійного введення, так і при моделюванні запального процесу, що був схожий до ефектів німесулід.
5. При дії сполуки Les-6490 виявлено підвищення рівня кальцій-іонів у сироватці крові піддослідних тварин.
6. Досліджену сполуку можна вважати перспективною для подальших досліджень, як речовину з протизапальною дією та гіполіпідемічним ефектом.

Результати вищезгаданих досліджень опубліковані у статтях [120, 286].

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ ІНДУВАНОВОГО АД'ЮВАНТОМ ФРЕЙНДА

Дослідження розвитку індукованого запального процесу проводилось за методикою [186].

Спостереження проводилось в трьох групах тварин по 6 особин – група А – тваринам вводився ад'ювант у подушечку стопи задньої лапки (К – контроль), група AL – ад'ювант вводився на фоні введення сполуки Les-6490, група AN – ад'ювант вводився на фоні введення німесулідіду.



a1



a2

Фото 5.1 Кінцівка щура у нормі (*a1*) та з індукованим запальним процесом (*a2*).

Розвиток запального процесу оцінювався в балах: 0 балів – відсутність еритеми та набряку; 1 бал – легка еритема або набряк; 2 бали – помірний набряк та еритема від щиколотки до плюснової кістки; 3 бали – сильний набряк та еритема від щиколотки до плюснової кістки; 4 бали – набряк, еритема, обмеження пасивної рухливості – неможливість зігнути щиколотку до гомілки. Спостереження починались з першого дня з інтервалом у два дні до закінчення досліду (14-й день). Результати показані в табл.5.1, фото 5.1.

Розвиток запального процесу при дії німесуліді та сполуки Les-6490

Групи тварин	Дні спостережень						
	1	3	5	7	9	11	13
А (бали)	0	1	2	3	4	4	4
AL (бали)	0	0	1	1	2	3	3
AN (бали)	0	1	1	2	3	4	4

А – ад'ювант Фрейнда; AL – Ад'ювант на фоні введенні препарату; AN – ад'ювант на фоні введення німесуліді.

Результати спостережень вказують на деяке сповільнення розвитку запального процесу під впливом досліджуваної сполуки Les-6490 та німесуліді. У контрольній групі перші ознаки запального процесу (еритема) – 1 бал – виявлялась з третього дня спостереження, набряк – з 5-го (2-3 бали), а сильний набряк з обмеженням пасивної рухливості (4 бали) з – 9-го. В групі AL перші ознаки запалення відзначено на 5-тий день спостережень; у цій групі не виявлено чотирибального розвитку запального процесу. У групі AN максимальний розвиток запального процесу виявлявся на 2-3 дні пізніше.

Отже, сполука Les-6490 спричиняла сповільнення розвитку та інтенсивності проявів запального процесу порівняно з іншими групами спостереження.

При спостереженні за розвитком запального процесу одночасно оцінювали кількісні показники за окружністю лапки в зоні максимального вираження запального процесу. При цьому застосовано гнучку лінійку з міліметровою шкалою. Результати показані в табл.5.2. та рис.5.1.

У групі А наростання кількісних показників запалення спостерігалось з третього дня після введення ад'юванту. На сьомий день відзначено наростання окружності ураженої ділянки у 1,5 раза, на 9-й день у 1,7 раза, а до кінця дослідження (13 день) – в 1,9. При дії сполуки Les-6490 у такі самі часові інтервали збільшення цього показника становили відповідно 1,1; 1,2 та 1,6 раза (фото 5.2). Тобто відзначено зниження показників розвитку запального процесу порівняно з групою А. При дії німесулід у сьомий день окружність зони ураження була більшою на п'ятий день у 1,2 раза, на 9-й день – 1,5 раза, на 13-й день – в 1,8 раза. Різниця між показниками групи А та AL на 11 і 13 статистично достовірна (значення $p < 0,01$) та між показниками груп AL і AN (значення $p < 0,01$).

Таблиця 5.2

Кількісні показники розвитку запального процесу

Групи тварин	Результати вимірювань кінцівки під дією ад'юванта по днях (в мм)						
	1	3	5	7	9	11	13
А	5,0 ±0,34	5,3 ±0,41	5,5 ±0,34	7,4 ±0,34	8,5 ±0,34	9,1 ±0,15*	9,4 ±0,74*
AL	5,0 ±0,25	5,2 ±0,16	5,4 ±0,15	5,7 0,21±	5,8 ±0,2	7,7 ±0,42 [#]	7,9 ±0,36 [#]
AN	4,9 ±0,10	5,4 ±0,29	5,6 ±0,2	5,8 ±0,29	7,2 ±0,26	8,5 ±0,48**	9,0 ±0,23**

Примітки: - достовірні показники різниці між групами А* та AL[#], а також між групами AL[#] та AN**



Фото 5.2 Кінцівка щура, з індукованим запаленням та введенням сполуки Les- 6420 на 13-й день експерименту.

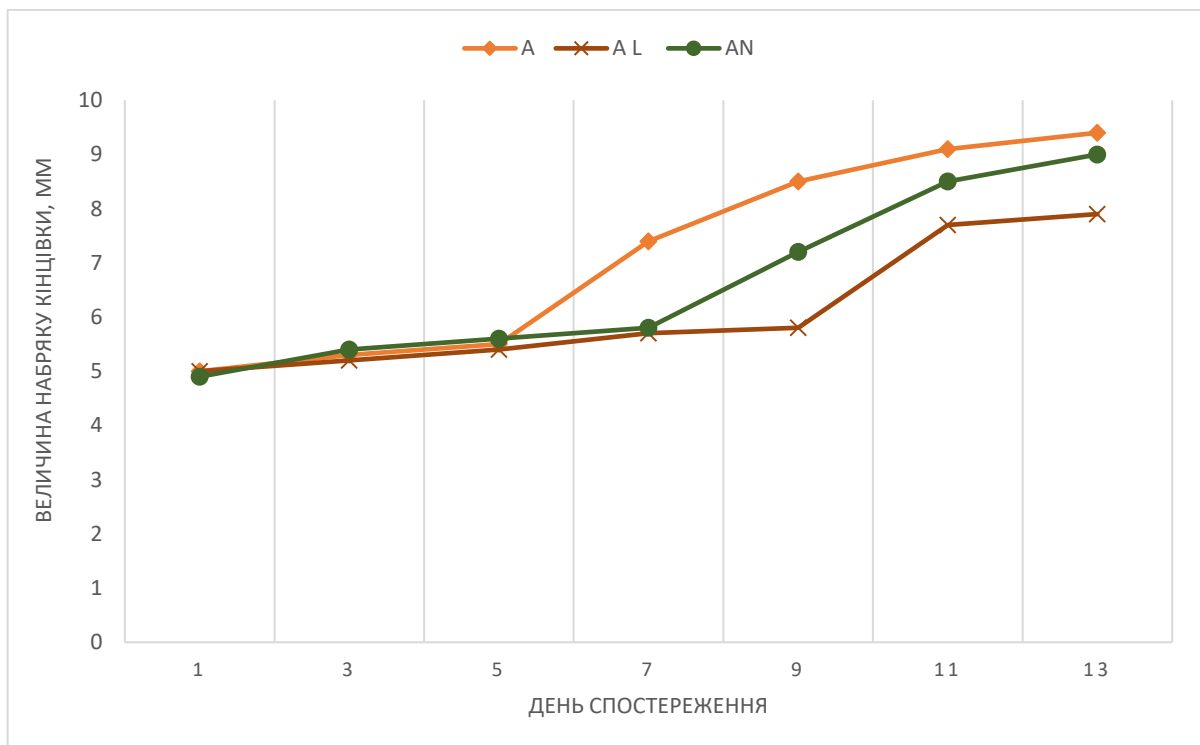


Рисунок 5.1 Вплив сполуки Les-6490 та німесулідю на діаметр лапи щурів з індукованим АФ запаленням, мм ($M \pm m$, $n=6$).

Висновки до розділу 5

Сполука Les-6490 спричиняла сповільнення розвитку та інтенсивності проявів запального процесу порівняно з іншими групами спостереження.

Результати вищезгаданих досліджень опубліковані у статті [120].

РОЗДІЛ 6

МЕТАГЕНОМНИЙ АНАЛІЗ

6.1. Аналіз складу мікробіомів кишкового каналу експериментальних тварин

Склад мікробіомів кишкового каналу досліджено у чотирьох групах тварин: К – контроль, А – тварини з індукованим запаленням, AL – тварини, що одержували новосинтезовану сполуку Les-6490 на фоні індукованого запалення, L – тварини, що одержували тільки сполуку Les-6490. Дослідження проводилися при виведенні тварин з досліду. З урахуванням того, що склад інтестинальної мікрофлори змінюється у дистальному напрямку, матеріал відбирався у чітко визначеній ділянці товстої кишки (середина поперекової кишки). У групі L матеріал також містив зріз слизової оболонки. Такий підхід дає можливість оцінити пристінкову мікрофлору як компонент субмікробіому.

Секвенування 16S рРНК

Екстракція ДНК, секвенування та кількісний аналіз мікробіому проводили компанією Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. Для вивчення складу мікробної спільноти в кожному зразку було отримано операційні таксономічні одиниці (OTU) шляхом кластеризації з 97% ідентичністю на ефективних мітках усіх зразків, а потім ідентифіковано. Амплікон секвенували на платформі парних кінців Illumina для створення зчитувань парних кінців розміром 250 bp (Raw PE). Потім об'єднали та попередньо обробили для отримання чистих тегів.

Загальна ДНК геному зі зразків була виділена методом СТАВ/SDS. Концентрацію та чистоту ДНК контролювали на 1% агарозному гелі. Відповідно до концентрації, ДНК розбавляли до 1нг/мкл стерильною водою. Гени 16S рРНК були ампліфіковані за допомогою специфічних праймерів (16S V4: 515F-806R, та ін.). Всі ПЛР-реакції проводили за допомогою Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

Метод секвенування генів 16S рРНК дав можливість об'єднати отримані окремі файли FASTQ, а відфільтровані послідовності забезпечували зчитування не менше ніж 400 нуклеотидних послідовностей. Це дало змогу кластеризувати

подібні варіанти та виділити окремі таксономічні одиниці виду та роду бактерій [147, 148].

У цьому розділі проказані результати досліджень просвітної мікрофлори кишкового каналу за описаною у відповідному розділі методикою.

6.1.1 Відносна кількість таксонів у біоматеріалі окремих груп

OTU, одержані на основі 16S рРНК після відповідних процедур обробки, були класифіковані за генетичними мітками таксони, а результати візуалізовані у вигляді теплової карти (рис 6.1) та додаток 5. Такі дослідження дають можливість виявити подібність чи відмінність складу мікробіомів в біоматеріалі піддослідних тварин на рівні високих таксонів – Phylum (тип).

Виявлено 29 таких таксонів.

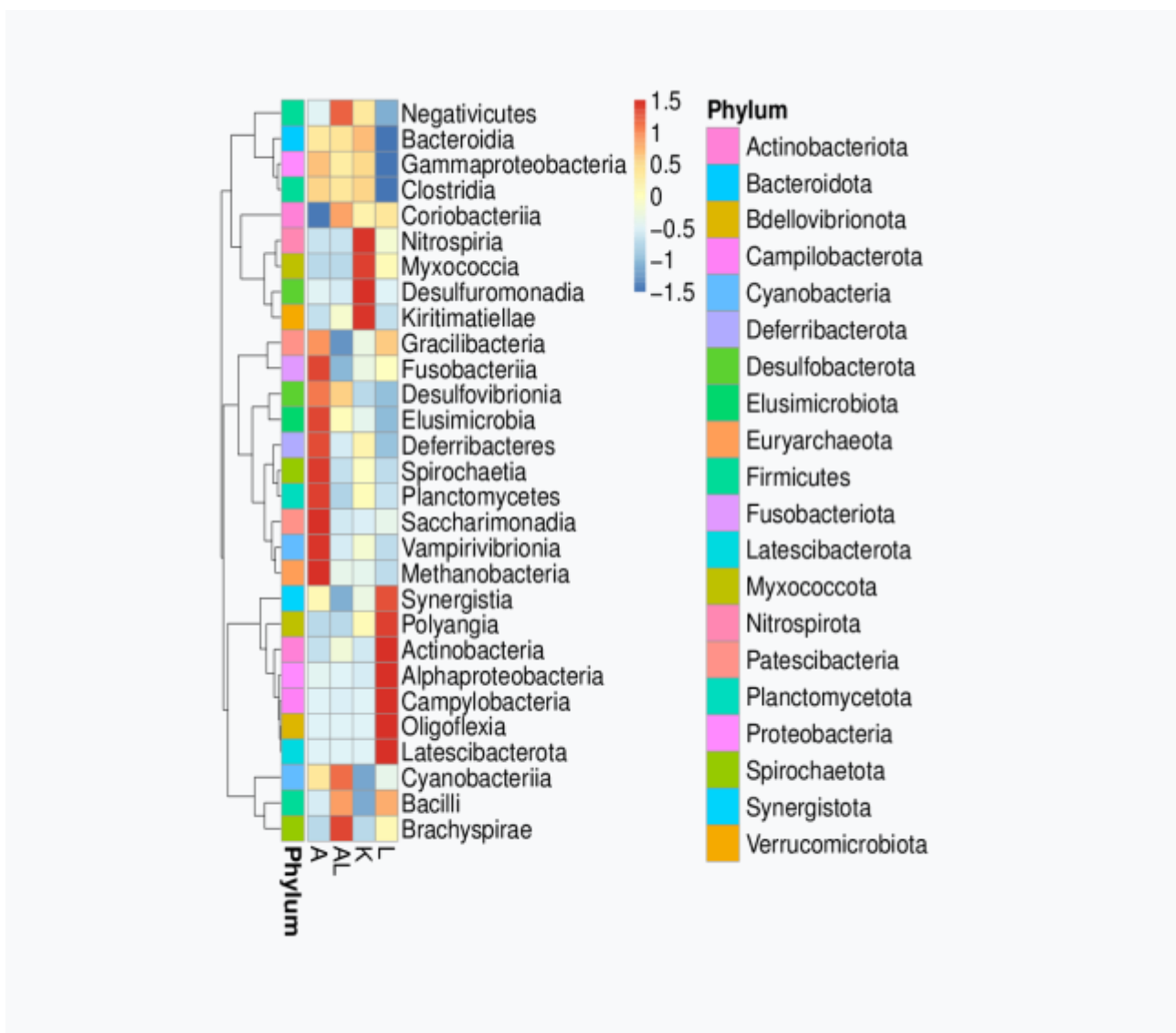


Рис.6.1 Теплова карта кластера таксономічної чисельності

Як видно з рис. 6.1, в окремих групах тварин, з одного боку, виявлені відмінності відносного кількісного вмісту таксонів, а з другого – більшість таксонів виявлялась у зонах, що відносяться до значних і помірних кількостей. У правій колонці показано основні таксони, до яких входять представники родів і видів прокаріотів, котрі мають значення для оцінювання мікроекологічного, фізіологічного чи патофізіологічного впливу на організм людини або тварин. На основі цієї інформації в кожній групі відібрано 10 таксонів різних рангів: клас, порядок, родина.

Кількісні показники візуалізовано на рис 6.2, на якому показано гістограму розподілу відносної чисельності таксонів різних рангів та табл. 6.1.

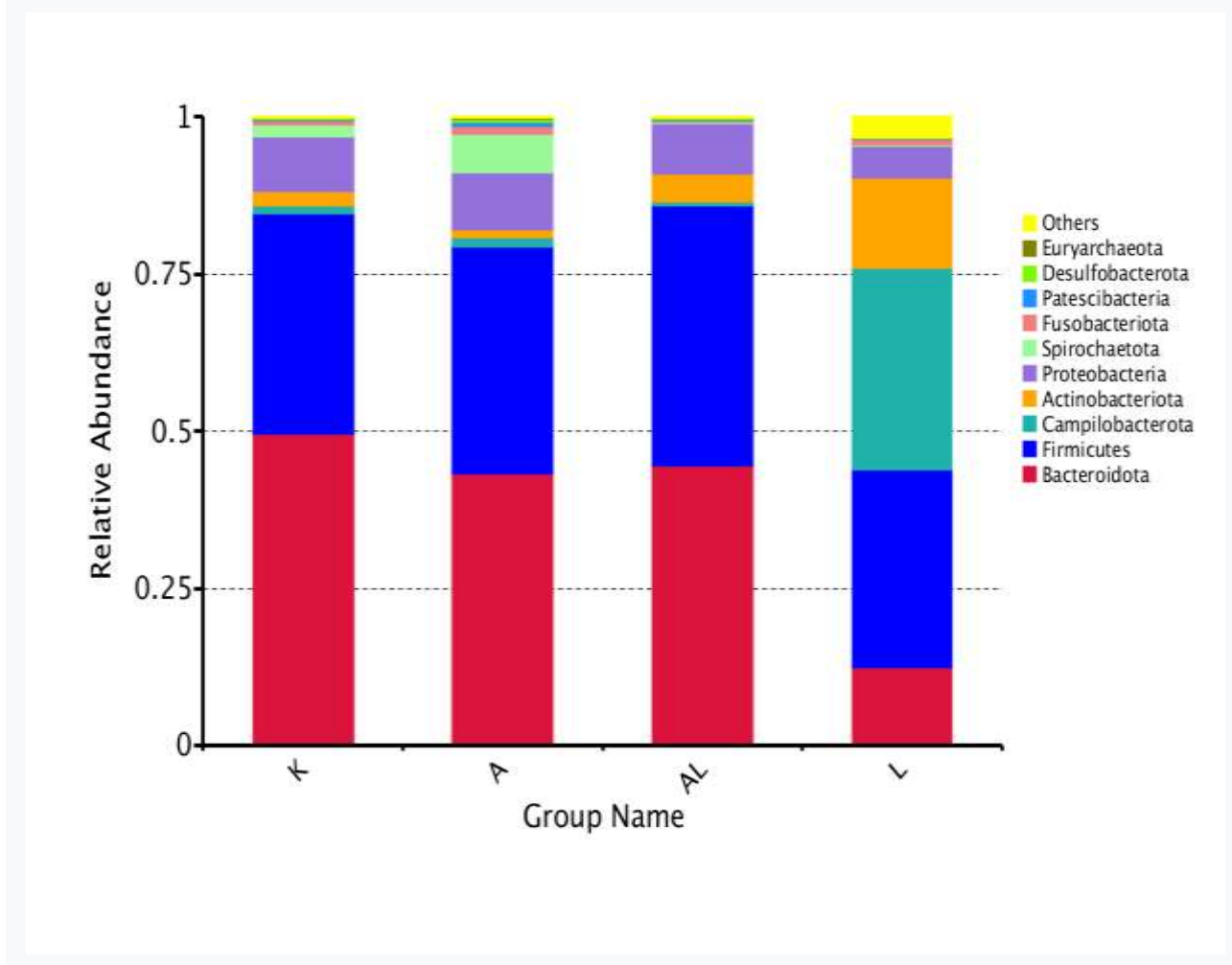


Рис. 6.2 Відносна чисельність таксонів у типі

Відносна чисельність таксонів у типі

Taxonomy	Bacteroidc	Firmicutes	Campiloba	Actinobaci	Proteobac	Spirochaet	Fusobacte	Patescibac	Desulfoba	Euryarchae	Others
K	0.496872	0.349377	0.013755	0.022575	0.085809	0.020582	0.005751	0.001383	0.001903	0.000379	0.001614
A	0.433412	0.360393	0.014574	0.013106	0.090451	0.060671	0.012673	0.007120	0.003762	0.002602	0.001235
AL	0.445746	0.413121	0.006559	0.043743	0.080178	0.002811	0.002705	0.001025	0.002929	0.000407	0.000775
L	0.123771	0.314655	0.321845	0.143754	0.051409	0.001589	0.006997	0.002058	0.000515	0.000017	0.033390

Як видно з рис.6.2, у групах K, A, AL склад мікробіомів подібний — переважають таксони Bacteroidota, Proteobacteria, Firmicutes. У групі L порівнянні з іншими групами, міститься більша відносна кількість бактерій таксонів Campilobacterota та Actinobacteriota.

На рис. 6.3 та табл.6.2 показано відносний вміст бактерій окремих родів, які можуть вміщати види, патогенні та умовно-патогенні для людини та тварин. При цьому мікробіом групи L значно відрізняється від мікробіомів інших груп за рахунок високого вмісту, бактерій роду *Helicobacter*. Одночасно в цій групі значно знижений рівень бактерій родини *Muribaculaceae*, типової для мікрофлори гризунів, котра, ймовірно, має значення у фізіологічних процесах у кишковому каналі, розкладаючи полісахариди слизу з утворенням бутирату. Проте, основним мікробіотопом для анаеробів *Muribaculaceae* є просвіт кишкової трубки, оскільки там забезпечується відновний редокс-потенціал – необхідна умова розмноження цих бактерій [222].

Важливо, що в групах AL і L, котрі одержували сполуку Les-6490 не виявляються прокаріоти роду *Treponema*, що може вказувати на протитрепонемну дію цієї сполуки (додаток б).

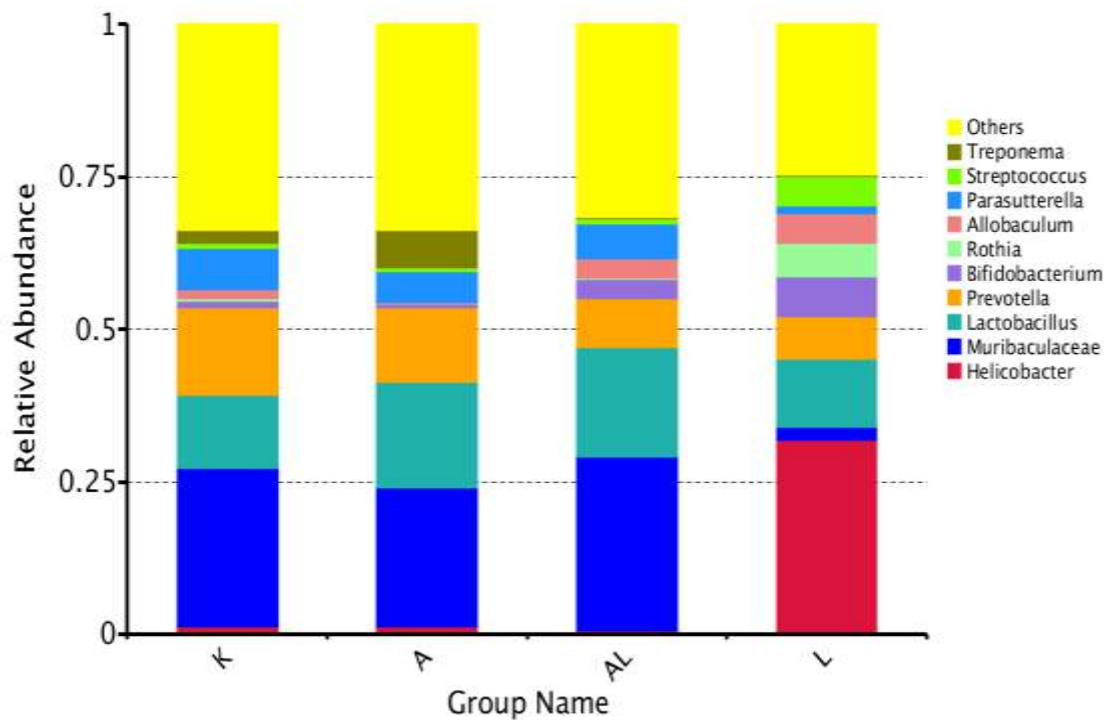


Рис. 6.3 Відносна чисельність таксонів родових рангів

Таблиця 6.2

Відносна чисельність таксонів родових рангів

Taxonomy	Helicobact	Muribacul	Lactobacil	Prevotella	Erysipelotr	Bifidobact	Micrococc	Sutterellac	Streptococ	Spirochaet	Others
K	0.012748	0.261120	0.119382	0.199670	0.051860	0.010251	0.003219	0.067843	0.008877	0.020582	0.244450
A	0.013366	0.228566	0.173630	0.159975	0.020026	0.006391	0.001784	0.050336	0.005623	0.060671	0.279633
AL	0.005900	0.288226	0.180353	0.137754	0.054485	0.032711	0.001268	0.057961	0.007570	0.000011	0.230973
L	0.318468	0.021964	0.110903	0.089868	0.074093	0.064845	0.056630	0.012021	0.048730	0.000004	0.200894

6.1.2 Дослідження альфа-індексів різноманітності

Для дослідження, оцінювання та опису мікробіоти певних біотопів, зокрема кишкового каналу людини та тварин, в останні роки широко застосовуються екологічні методи та відповідна термінологія. Для аналізу різноманітності

кишкової мікробіоти застосовують підходи та визначення альфа- і бета-різноманітності. Особливістю мікробіологічних досліджень з екологічним підходом є те, що традиційними мікробіологічними методами виявляють незначну частину окремих складових мікробіомів. Тому основними для дослідження мікробних спільнот стали методи геноміки. В основі цих методів є генерація операційних таксономічних одиниць (OTU) різного таксономічного рівня від доменів і філумів, до окремих видів чи варіантів одного виду. При цьому таксономія, заснована та визначеннях структури геномів не завжди збігатися з традиційною класифікацією за фенотиповими ознаками та продовжує інтенсивно вивчатися. Тому аналіз мікробіоценозів окремих біотопів потребує поєднання різних статистичних методів оцінювання складу мікробіомів або відмінностей між певними біотопами. У наших дослідженнях визначалась альфа- і бета-різноманітність мікробіоценозів кишкового каналу піддослідних щурів під дію новосинтезованої сполуки Les-6490 на фоні місцевого запального процесу, спричиненого ад'ювантом Фрейнда.

Альфа-різноманітність відображає склад та взаємовідношення окремих видів мікроорганізмів в конкретному біотопі на основі аналізу OTU. Гомологічними для певного таксона вважались (OTU), згенеровані з 97% ідентичністю генетичних маркерів (пори́г кластеризації). При цьому застосовувались відповідні принципи нормалізації складу OTU й обмеження глибини зчитування – 103863. Дослідження зразків, відібраних у кожній групі тварин включали криві різноманіття, бокс-плот нагромаджених видів та серію статистичних обчислень.

6.1.2.1 Крива біорізноманіття

Крива біорізноманіття досліджувалась в кишкових біотопах чотирьох груп тварин: К – контрольна група, А, AL (зразок з просвіту кишки) і L (зразок, що містив також пристінкову мікрофлору). Результати показані на рис.6.4.

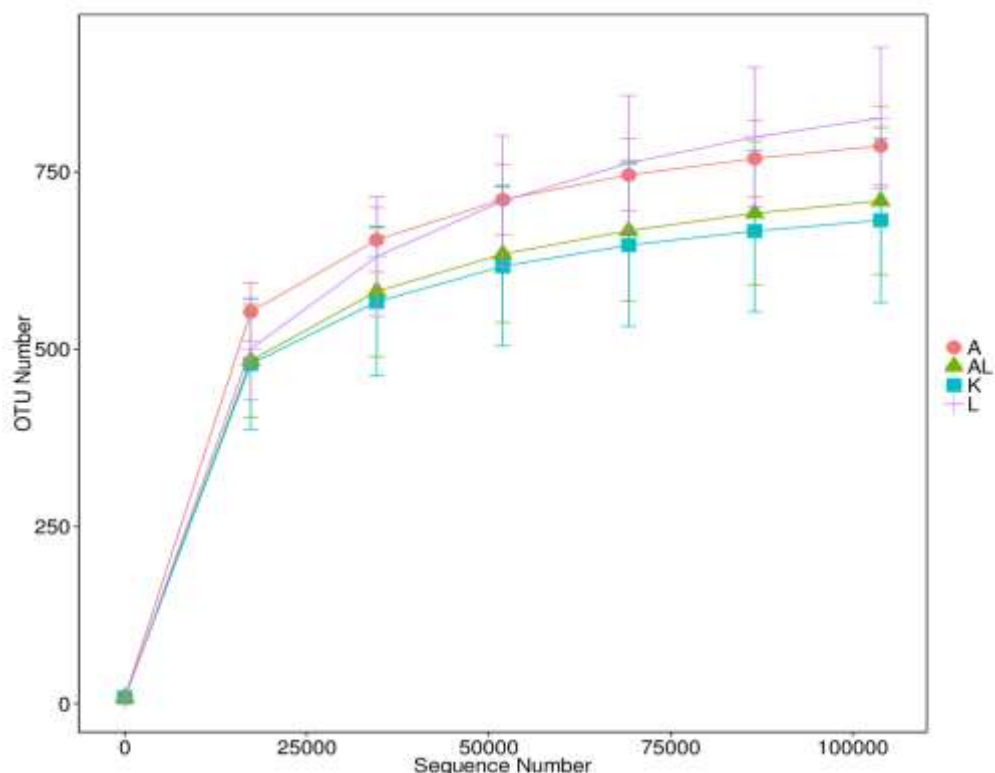


Рис.6.4 Криві біорізноманіття у тварин різних груп.

На цьому графіку на вертикальній осі Y відображається кількість OTU, а на горизонтальній осі X – показники глибини (або кількості) зчитувань. З графіка видно, що найбільший приріст OTU спостерігається при збільшенні глибини зчитувань від 0 до 15000, коли крива різко зростає, а далі відбувається сповільнене зростання. Варто зазначити, що при збільшенні глибини зчитування виявляються таксони, що містяться у мінімальних кількостях. У даному випадку можна відзначити, що найбільша кількість виявлених OTU, які присутні в пробі в щораз меншій кількості, тобто найбільша різноманітність, виявлена в групі L, очевидно, за рахунок включення в досліджуваний матеріал пристінкової мікрофлори. Крива біорізноманіття в групах K і AL мало відрізнялась між собою, проте показала менше біорізноманіття, ніж у групах A і L. Таким чином, до факторів, що впливають на альфа-різноманіття кишкових мікробіомів, ймовірно, належать запальні медіатори (група A) та досліджувана сполука Les-6490 (групи AL і L).

Для подальшого дослідження альфа-різноманіття застосована візуалізація результатів на основі побудови коробкових (box-plot) діаграм

[https://documentation.sas.com/doc/en/pgmsascdc/9.4_3.4/statug/statug_boxplot_overview.htm].

Діаграми на рис.6.5 складені на основі індексів ACE – Abundance-based coverage estimators (індекс оцінки охоплення на основі чисельності). Це непараметричний метод для оцінки кількості видів на основі охоплення певної вибірки за сумою ймовірностей виявлення таких видів. При цьому виявлені види поділяються на групи з високою і низькою ймовірністю виявлення.

Достовірність різниці між групами визначалась за T- тестом Wilcox для двох груп і Wilcox and Tukey у випадках порівняльного дослідження більше ніж двох груп.

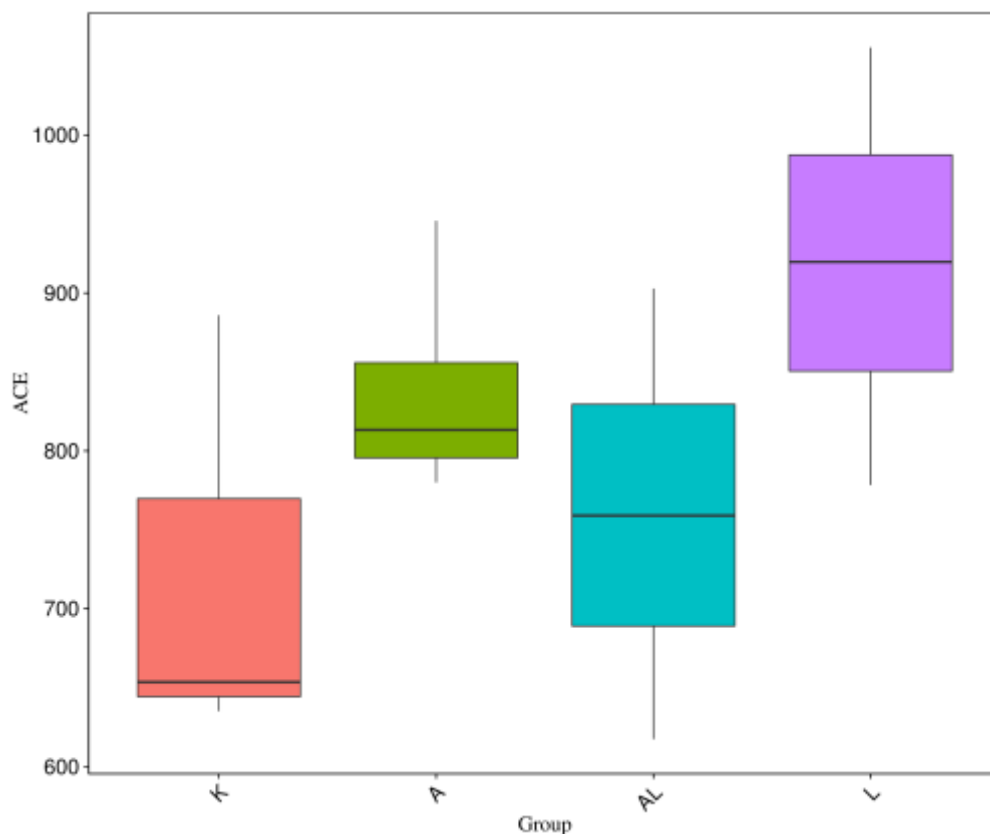


Рис. 6.5 Коробкові діаграми різниці в досліджуваних групах за числовими показниками індексу ACE.

На кожній з діаграм показана відносна чисельність виявлених видів. Діаграми складено як суму квантилів, (квантиль відображає 20% кількість виявлених OTU. У кожній «коробці» горизонтальна лінія – медіана, що відображає середню кількість OTU, а вертикальні лінії – межі відхилень від

медіани. Певними особливостями характеризується група К – асиметричне розміщення медіани відображає збільшення кількості таксонів із значним індексом ACE. Більш симетричними є діаграми груп AL та L, проте розкид числових показників (вертикальні лінії), що відображає відхилення від медіани, вказує на недостаню достовірність різниці між усіма групами. Це підтверджується Т-тестом Wilcox: Між групами А та AL значення $p=0,43$; $Z=2,50$, а між групами К та А значення $p=0,33$, $Z=3,43$

Таблиця 6.3

Т-тест Wilcox

Групи порівняння	Різниця між групами	значення p	Нижній довірчий інтервал	Верхній довірчий інтервал
A – AL	2.500	0.434	-4.270	9.270
A – K	3.416	0.326	-3.896	10.725
A – L	-2.250	0.479	-9.020	4.520
AL – K	0.916	0.787	-6.396	8.229
AL – L	-4.75	0.151	-11.52	2.020
K – L	-5.67	0.116	-12.98	1.646

6.1.2.2 Альфа-різноманіття на основі аналізу цілого дерева – PD_whole_tree.

Спосіб статистичного дослідження phylogenetic diversity whole tree (PD whole tree – філогенетичне різноманіття «цілого дерева» застосовується для

дослідження альфа-різноманітності на основі виявлення філогентично споріднених таксонів [189].

На рис. 6.6 зображена візуалізація досліджень «цілого дерева» методом box-plot в матеріалі, відібраному у тварин досліджуваних груп.

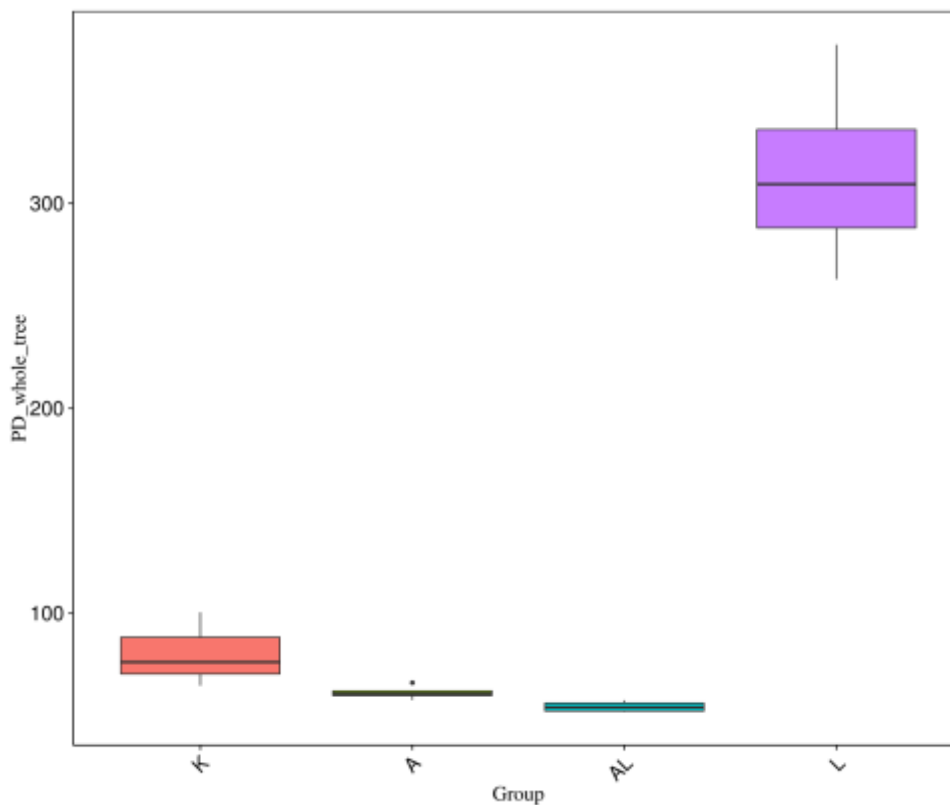


Рис. 6.6 Коробковий графік цілого дерева PD.

Тест Wilcoxon Signed Rank для парних зразків: A–AL ($Z=4,25$ $p=0,0017$), A–K ($Z=2,92$, $p=0,024$), AL–K ($Z=7,17$ $p=0,0001$)

Як видно з рис. 6.6 методом оцінювання «цілого дерева» PD показало значну різницю між усіма групами. Достовірна різниця виявлена між групами A–K, що вказує на можливий вплив медіаторів запалення на мікрофлору кишкового каналу. Сполука Les-6490, ймовірно, впливає на альфа-різноманіття, оскільки різниці між групами K–AL достовірна при значеннях $p < 0,001$ та $Z = 7,2$. Значна відмінність альфа-різноманіття групи L очевидно, пов'язана з вмістом у зразку філогенетично споріднених таксонів пристінкової мікрофлори при дії сполуки Les-6490.

6.1.3 Аналіз бета-різноманітності

Екологічний термін «бета-різноманіття» стосується досліджень складу біотопів, що відрізняються за екологічними нішами або перебувають під впливом екологічно значимих чинників. У мікробіологічній екології бета-різноманіття досліджується при порівнянні особливостей складу у різних біотопах та суббіотопах макроорганізму, а також при дії факторів, що впливають на склад мікробіоти, зокрема антибіотиків. У наших дослідженнях вивчалися ознаки бета-різноманіття кишкової мікрофлори в експериментальних тварин чотирьох груп К (контроль), А – тварини індукованим ад'ювантом запаленням, AL - тварини, що одержували новосинтезовану сполуку Les-6490 на фоні індукованого запалення та група L, що одержували вказану сполуку без запалення. Щоб порівняти особливості мікробіоти між кожною парою зразків матеріалу від експериментальних тварин, була розрахована квадратні матриці «відстані» або «незбіжності», з використанням статистичних методів: незваженої відстані» Unifrac і Weighted Unifrac.

Незважена відстань UniFrac, надає інформацію про наявність і відсутність видів і підраховує частку довжини гілки, унікальну для будь-якої спільноти [47]. Результати дослідження показані на рис. 6.7.

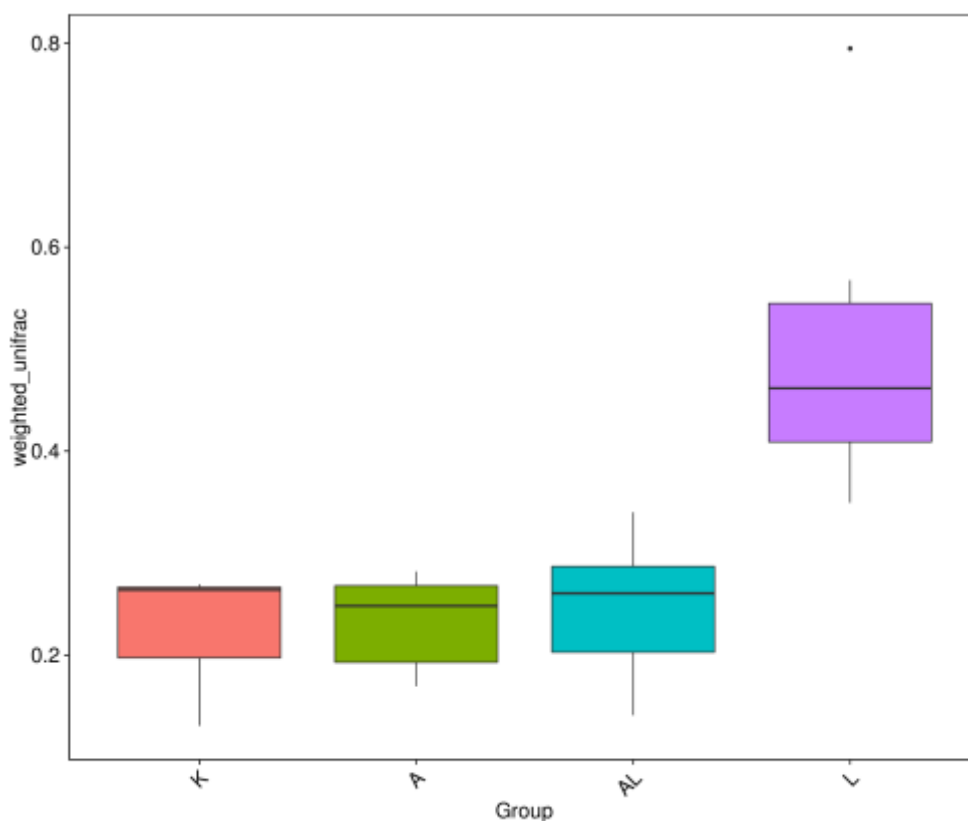


Рис. 6.7 Коробковий графік на основі незваженої відстані Unifrac.

Тест Wilcoxon Signed Rank для парних зразків: значення $p > 0,05$ між групами A-AL, A-K, K-AL, значення $p < 0,05$ для груп A-L, K-L і AL -L.

Як видно з рис. 6.7, виявлена достовірна різниця бета-різноманітності між контрольною групою K та групами AL й L, що вказує на певний вплив досліджуваної сполуки на інтестинальний мікробіом. Проте, різниця між групами AL та L недостовірна, отже сполука Les-6490 спричинює односпрямовану дію як на інтестинальний мікробіом тварин з індукованим запаленням, так і на мікробіом тварин, у яких запалення не викликалось.

6.1.3.1 Аналіз головних компонентів з кластерним перетворенням

Аналіз головних компонентів – це статистична процедура, котра передбачає виявлення основних компонентів (видів або OTU) і відображення їх кількості в багатовимірній (ортогональній) системі координат. Одержані результати можуть підлягати математичному перетворенню в систему двовимірних координат на котрих відображається різноманітність зразків зі зменшенням розмірності даних з наступною візуалізацією. Тобто варіації багатовимірних даних відображаються на двовимірних графіках. При цьому чим більша збіжність складу мікробіоти, тим ближча відстань між їхніми точками на двовимірному графіку. Близькі між собою компоненти зразків (OTU) можуть об'єднуватися в кластери [73].

Результати аналізу головних компонентів PCA показано на рис.6.8.

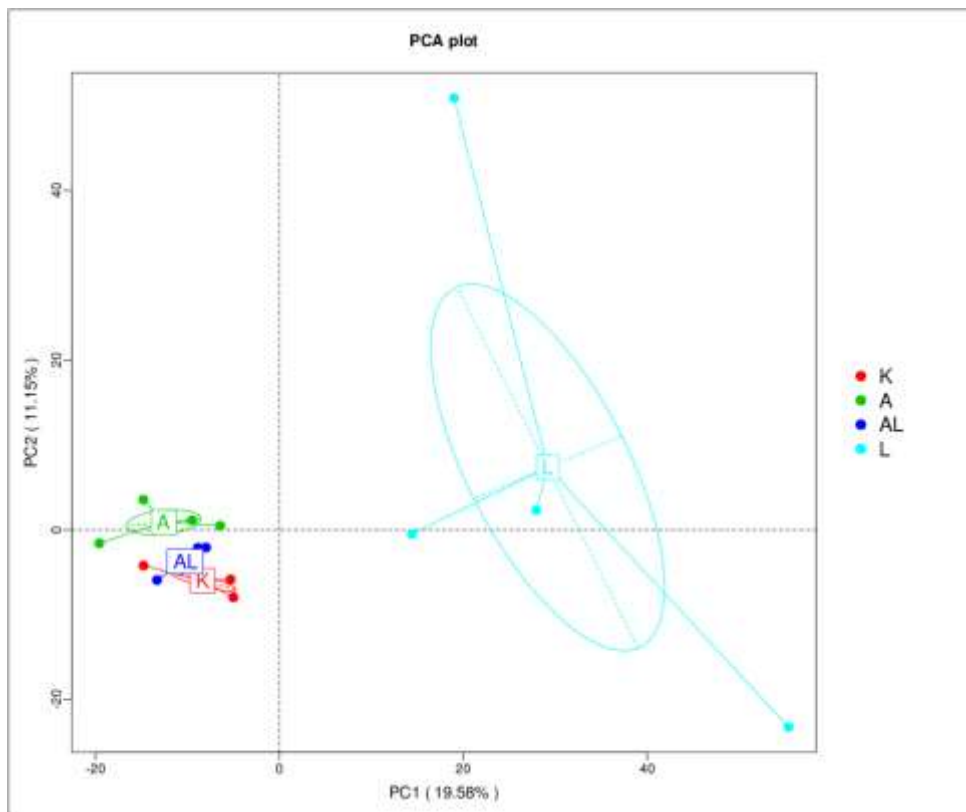


Рис. 6.8 PCA з кластерним розподілом

На рис. 6.8 відображено 3 кластери: А, що відображає головні компоненти групи інтестінальної мікрофлори тварин з індукованим запаленням. Кластер К – контрольна група і близький до нього кластер АL, в якому відображено головні компоненти в групі тварин, що одержували сполуку Les-6490 на фоні індукованого запалення. Можна відмітити, що великих розбіжностей між цими кластерами не виявляється, можливо, внаслідок протизапальної дії препарату. Це підтверджується результатами в групі L. Головні компоненти цієї групи за кількісними характеристиками відрізнялись від інших груп, можливо, внаслідок вищого біорізноманіття зменшення якого в групах А залежить від запалення, спричиненого ад’ювантом. Це доведено незначною різницею між показниками груп між групами К та L та може вказувати на те, що сполука Les-6490 істотно не змінює різноманіття інтестінальної мікробіоти порівняно з інтактними тваринними.

6.1.3.2 Результати аналізу досліджень з використанням неметричного багатовимірного шкалювання NMDS

Неметричні статистичні методи передбачають ранжування отриманих результатів, тобто розподіл усіх даних за рангами, де кожен ранг включає декілька схожих показників (кластер). Для цього застосовується багатовимірне шкалювання. Цей метод використовується для відображення даних екологічних досліджень, де досліджувані об'єкти є дискретними, тобто не мають лінійних характеристик. У наших дослідженнях метод NMDS був застосований для оцінки бета-різноманітності мікрофлори кишечника на основі OTU у досліджуваних групах тварин. Результати для кожної групи були розділені на 4 ранги (див. рис. 6.9). Символи кожної групи розміщені на графіку відповідно до середніх значень та стандартного квадратичного відхилення рангових балів [47, 237].

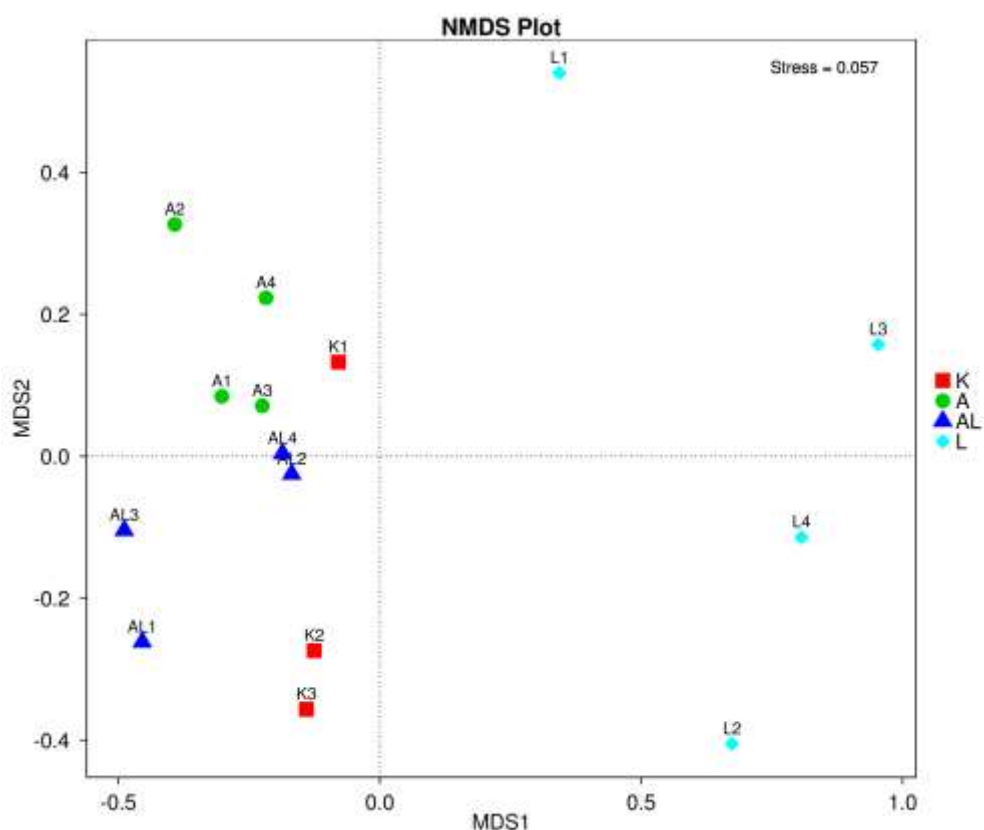


Рис. 6.9 Неметричний багатовимірний аналіз.

Результати візуалізовані на рис. 6.9 в групі К розподіл символів допустимо відхилений від нульової лінії. У групі А відхилення зміщені в позитивному

напрямку, а в групі AL – в негативному. Це може вказувати на дію досліджуваних факторів – у групі А – індуктора запалення, а у групі AL – на пригнічення запалення сполукою Les-6490. Розподіл символів у групі L наближається до максимумів кривої нормального розподілу, що може вказувати на відсутність значного впливу сполуки на різноманіття кишкового мікробіому, що містить компоненти пристінкової мікрофлори. Інтерпретація цих даних збігається з результатами PCA (рис. 6.8 та 6.9).

6.1.3.3. Аналіз процедури перестановки з кількома відповідями (MRPP).

Статистичний метод MRPP дає можливість визначити, чи є суттєвою різниця в структурі мікробного співтовариства між групами [47].

Зазвичай його застосовують із такими методами зменшення розмірів, як PCA та NMDS, результати яких подано вище. У табл.6.4 наведено результати попарного порівняння даних, одержаних при дослідженнях біоматеріалу у чотирьох групах піддослідних тварин.

Таблиця 6.4

Результати досліджень за процедурою перестановки з кількома відповідями (MRPP)

Досліджений біоматеріал	група	А	Спостережувана дельта	Очікувана дельта	Значимість р
З просвіту кишки	А-К	0,07	0,49	0,52	0,09
З просвіту кишки	А-AL	0,06	0,48	0,51	0,05
З просвіту кишки	AL-К	0,06	0,47	0,50	0,12
З вмісту слизової	AL-L	0,23	0,50	0,64	0,03
З вмісту слизової	А-L	0,20	0,51	0,64	0,03
З вмісту слизової	К-L	0,20	0,50	0,63	0,03

У нашому дослідженні спостережувана дельта не відрізняється в групах, а очікувана дельта вища порівнюючи з результатами у біопробах, котрі вміщали біоматеріал зі слизової (групи порівняння К-L, AL-L, А-L $p=0,03$). При цьому показник у групі А більший одиниці (позитивне значення) при порівнянні з усіма

групами, а це вказує, що варіації між групами є більшими ніж у середині груп. Але різниця між групами AL-K недостовірна, ($p = 0,12$) тоді як різниця між групами A та AL ($p=0,034$), оскільки достовірними вважаються результати при $p < 0,05$. Це може опосередковано вказувати на позитивний вплив досліджуваної сполуки на склад мікробіому. Наведені результати одержані із застосуванням підходів ADONIS (пермутаційний MANOVA або непараметричний MANOVA) і аналізу молекулярної дисперсії.

6.2 МІЖГРУПОВИЙ АНАЛІЗ МІНЛИВОСТІ ВИДІВ

З метою виявлення впливу сполуки Les-6490 на мікробіоту шлунково-кишкового каналу (ШКК) проведено дослідження складу виявлених таксонів, які відрізнялися за кількісними показниками в різних групах тварин: К – контроль, А – тварини з запальним процесом, індукованим ад'ювантом Фрейнда, AL – тварини, що одержували сполуку Les-6490 на фоні індукованого запального процесу. Характеристика таксонів зі статистично достовірними рівнями відносного рівня кількісних показників у різних групах наведена в таблицях 6.5- 6.7 При цьому аналізувалися результати, приведені на рисунках 6.10 - 6.14, а також літературні дані.

Таблиця 6.5

Характеристика вищих таксонів, виявлених у піддослідних тварин

№	Виявлений таксон (порядок- Order)	Таксономія. Фенотипові ознаки, значення як елементу мікробіоценозу людини
1	Coriobacteriales	Phylum: Actinobacteriota; Class: Firmicutes; Order: <i>Coriobacteriales</i> Грампозитивні, оксидазонегативні палички, метаболізують жовчеві кислоти та стероїди, холестерин. Продуценти вітаміну К. Населяють відкриті порожнини людини та тварин. Умовно-патогенні види спричиняють пародонтит, вагіноз, сепсис
2	Aeromonadales	Phylum: Pseudomonadota; Class: <i>Gammaproteobacteria</i> ; Order: <i>Aeromonadales</i> . Грамнегативні оксидазопозитивні палички, ферментують глюкозу, є складовим водних біоценозів. Для людини- «нові» патогени, уражають ШКТ

3	Neisseriaceae	<p>Phylum: Proteobacteria;</p> <p>Class: Betaproteobacteria;</p> <p>Order: Neisseriales;</p> <p>Families: <i>Neisseriaceae</i>.</p> <p>Грамнегативні диплококи, аероби, ферментують глюкозу. Населяють відкриті порожнини людини та тварин. Патогенні види – <i>N. meningitidis</i>, <i>N. Gonorrhoeae</i></p>
4	Coriobacteriaceae	<p>Phylum: Actinobacteriota;</p> <p>Class: Firmicutes;</p> <p>Order: Coriobacteriales, характеристика – як у таксона 1.</p>
5	Succivibrionaceae	<p>Phylum: Pseudomonadota;</p> <p>Class: Gammaproteobacteria</p> <p>Order: Aeromonadales;</p> <p>Families: <i>Succivibrionaceae</i>;</p> <p>Грамнегативні оксидазопозитивні палички. Продукують сукцинат. Складові кишкових мікробіоценозів. Мають протизапальну дію.</p>

Таблиця 6.6

Характеристика таксонів рівня родин і родів, виявлених у піддослідних тварин

№	Виявлений таксон (родина та роди – Familia, Genus)	Таксономія. Фенотипові ознаки, значення як елементу мікробіоценозу людини
1	Faecalibacterium	<p>Phylum: Firmicuta;</p> <p>Class: Clostridium;</p> <p>Order: Eubacteriales;</p>

		<p>Familia: Ruminococaceae;</p> <p>Genus: Faecalibacterium</p> <p>Грампозитивні неспоріві палички, строгі анаероби, Складають більше 5% кишковї мікрофлори людини. Продукують значну кількість бутирату, який забезпечує енергетичні потреби колоноцитів і має протизапальнудію. Окремі види розглядаються як потенційні пробіотики (<i>F. Prausnitzii</i>)</p>
2	Neisseria	<p>Phylum: Proteobacteriota;</p> <p>Class: Betaproteobacterium;</p> <p>Order: Neisseriales;</p> <p>Families: Neisseriaceae</p> <p>Грамнегативні диплококи, аероби, ферментують глюкозу. Населяють відкриті порожнини людини та тварин. Патогенні види – <i>N. Meningitidis</i>, <i>N.gonorrhoeae</i></p>
3	Blautia	<p>Phylum: Firmicutf;</p> <p>Class: Clostridium;</p> <p>Order: Eubacteriales;</p> <p>Families: Lachnospiraceae;</p> <p>Genus: Blautia;</p> <p>Анаеробні, нерухливі, з сферичні або овальні. Метаболіти – оцтова, бурштинова, молочна кислоти та етанол. Продукують бактеріоцини, пригнічує розмноження <i>C. Perfringens</i> і ванкоміциноостійких ентерококів. Пригнічує нагромадження вісцерального жиру. Потенційний пробіотик.</p>

4	Lachnospiraceae	<p>Phylum: Firmicutf;</p> <p>Class: Clostridium;</p> <p>Order: Eubacteriales;</p> <p>Families: Lachnospiraceae</p> <p>Строгі анаероби, біотоп – кишковий канал людини і тварин- до 10% усієї мікрофлори. Виявляються протягом усього життя, продукують бутират. Вивчається значення у фізіологічних та патологічних процесах.</p>
5	Група NK3A20	<p>Phylum: Firmicutf;</p> <p>Class: Clostridium;</p> <p>Order: Eubacteriales;</p> <p>Families: Lachnospiraceae</p> <p>Природний біотоп – рубець жуйних тварин. Виявлені методами метагеноміки, більшість видів не культивується в лабораторіях. Продукують молекулярний водень, який проявляє антиоксидантний ефект в колоноцитах.</p>
6	Colinsella	<p>Phylum: Actinobacteriota;</p> <p>Order: Coriobacteriales;</p> <p>Families: Colinselliaceae;</p> <p>Грампозитивні палички, строгі анаероби, становлять значну частину кишкових мікробіомів. Виявлені кореляції між вмістом колінсел та розвитком автоімунних процесів, хвороби Альцгеймера, синтез інсуліну. Продукують ряд сигнальних молекул – імуномодуляторів, зокрема, які проявили позитивний вплив при імунотерапії меланоми.</p>
7	Anaerobiospirillum	<p>Phylum: Pseudomonadota;</p>

		<p>Class: Gammaproteobacteria;</p> <p>Order: Aeromonadales;</p> <p>Families: Succinivibrionaceae;</p> <p>Genus: <i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>.</p> <p>Рухливий грамнегативний облігатний анаероб спіралеподібної форми. Продукє сукцинат.</p> <p>Представник нормальної мікрофлори домашніх тварин. У людей може спричинити бактеріємію і сепсис.</p>
--	--	--

Таблиця 6.7

Характеристика таксонів – видів, виявлених у піддослідних тварин

№	Виявлений таксон (Вид – Species)	Таксономія. Фенотипові ознаки, значення як елементу мікробіоценозу людини
1	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<p>Phylum: Firmicuta;</p> <p>Class: Clostridium;</p> <p>Order: Eubacteriales;</p> <p>Familia: Ruminococaceae;</p> <p>Genus: Faecalibacterium;</p> <p>Species: <i>Faecalibacterium prausnitzii</i></p> <p>Грампозитивні неспоріві палички, строгі анаероби, Складають більше 5% кишковїї мікрофлори людини. Продукують значну кількість бутирату, який забезпечує енергетичні потреби колоноцитів і має протизапальну дію. Окремі види розглядаються як потенційні пробіотики (<i>F. Prausnitzii</i>)</p>
2	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<p>Phylum: Firmicuta;</p> <p>Class: Lactobacillum</p>

		<p>Order- Lactobacillales;</p> <p>Familia: Lactobacillaceae;</p> <p>Cenus: Lactobacillus;</p> <p>Species: <i>Lactobacillus johnsonii</i>.</p> <p>Грампозитивні анаеробні палички, постійні компоненти кишково мікрофлори. Продукують молочну кислоту. Застосовуються в біотехнології харчової промисловості. Використовуються як пробіотики. Продукують бактеріоцини. Патогенні властивості не виявлені.</p>
3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<p>Населяють кишковий канал людини і тварин. Виділяють антимікробні речовини з антибактеріальною, протигрибковою та антипротозойною дією. Стандартні штами використовується в харчових біотехнологіях як пробіотики.</p>
4	<i>Collinsella aerofaciens</i>	<p>Зустрічається у ШКТ. Можуть бути протизапальними мікроорганізмами, що продукують масляну кислоту. В деяких випадках модулюють протипухлинну імунну відповідь.</p>

Як видно з інформації, поданої у таблицях 6.5-6.7 та з літературних джерелах [45, 74, 80,110, 136, 290], виявлені таксони відносяться до філумів Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Pseudomonadota. На рівні таксону Class виявлено класи Lactobacillium, Clostridium, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria. Виявлені таксони відносяться до рядів (Order) – Coriobacteriales, Eubacteriales, Neisseriales, Aeromonadales, Lactobacillales. Ідентифіковано за генотипом родини (Familia) Neisseriaceae, Succinivibrionaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Collinsellaceae, Lactobacillaceae. Як окремі види за генотипом ідентифіковані *F. prausnitzii*, *L. johnsonii*, *L reuteri*. Більшість бактерій цих таксонів населяють

кишковий канал людини і тварин у значних кількостях. Як елементи мікробіоценозу ШКТ людини, вони проявляють протизапальну дію, продукують коротколанцюгові жирні кислоти, зокрема бутират. До умовно-патогенних відносять окремі види *Neisseria*, *Coriobacterium*, *Aeromonas*, *Anaerobiospirillum*. Як потенційні пробіотики пропонуються окремі види *F. prausnitzii*, *Lachnospiraceae*, *Blautia*. Проте більшість дослідників вказує на необхідність подальших досліджень регуляційних, імуномодуляційних, протизапальних та інших впливів бактерій з урахуванням властивостей окремих видів. Як пробіотики у харчових біотехнологіях застосовуються *L. johnsonii*, *L. reuteri*.

6.3. Аналіз міжгрупових варіацій видів із застосуванням t -тестового аналізу

Кількісні показники аналізу різноманітності видів в окремих групах підлягали статистичній обробці з використанням t-тестового аналізу для визначення коефіцієнта t і ступеня достовірності p . Візуалізація досліджень показана на рисунках 6.10 – 6.15. Ліва панель показує кількість видів, для яких виявлено значні відмінності між групами. У кожному стовпчику відображено середнє значення кількісних показників таксонів, названих на рисунку зліва. У правій панелі вказано довірчий інтервал варіацій між групами і 95% межа довірчого інтервалу для кожного дослідженого таксону. Центр круга показує різницю середнього значення, а колір вказує на групу, значення якої вище.

Міжгруповий t -тестовий аналіз таксонів рівня Order (порядок)

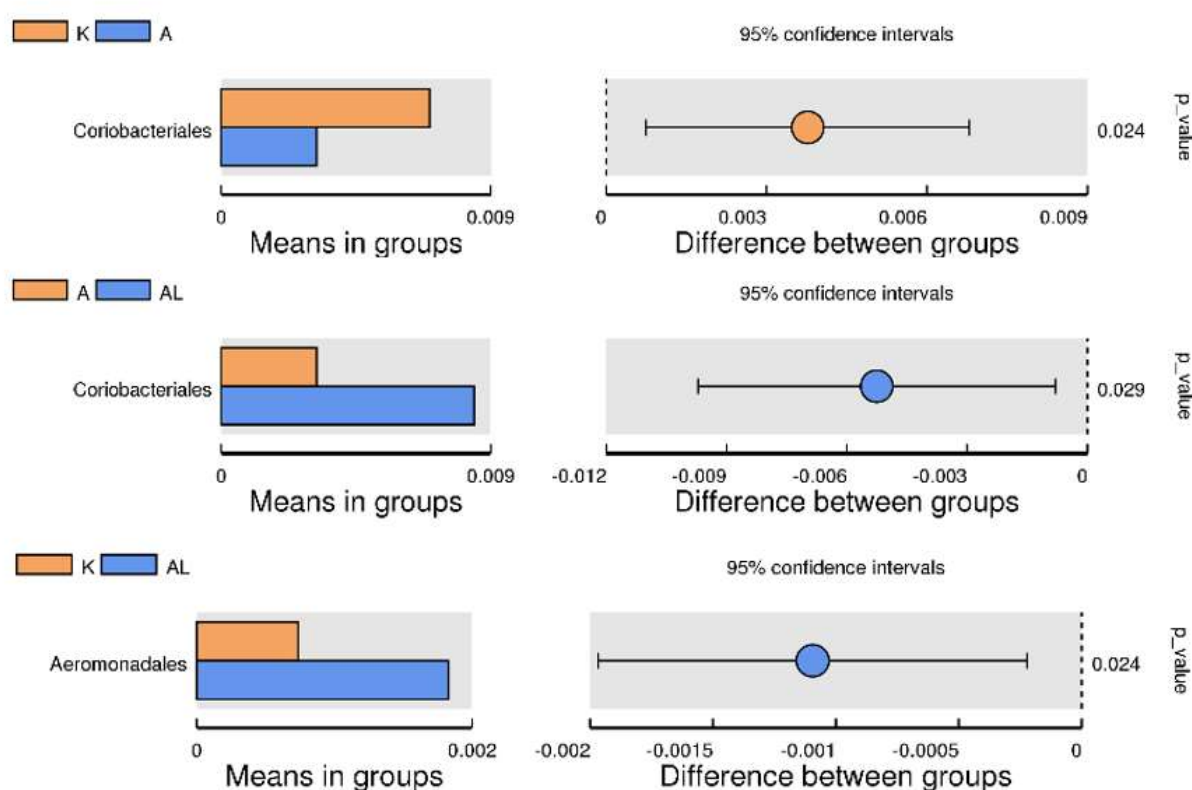


Рисунок 6.10 Міжгруповий t -тестовий аналіз (порядок Coriobacteriales, порядок Aeromonadales).

На рис. 6.10 показано результати досліджень виявлених бактерій порядків *Coriobacteriales* та *Aeromonadales* у групах тварин К, А та АL. Виявлено достовірне зниження відносної кількості бактерій *Coriobacteriales* в групі А порівняно з контролем. Проте, в групі АL, на фоні індукованого запалення, кількість бактерій *Coriobacteriales* та *Aeromonadales* зростала в порівнянні з групою АL у тварин, що одержували сполуку Les-6490 та ад'ювант [179].

Міжгруповий t-тестовий аналіз таксонів рівня Familia (родина)

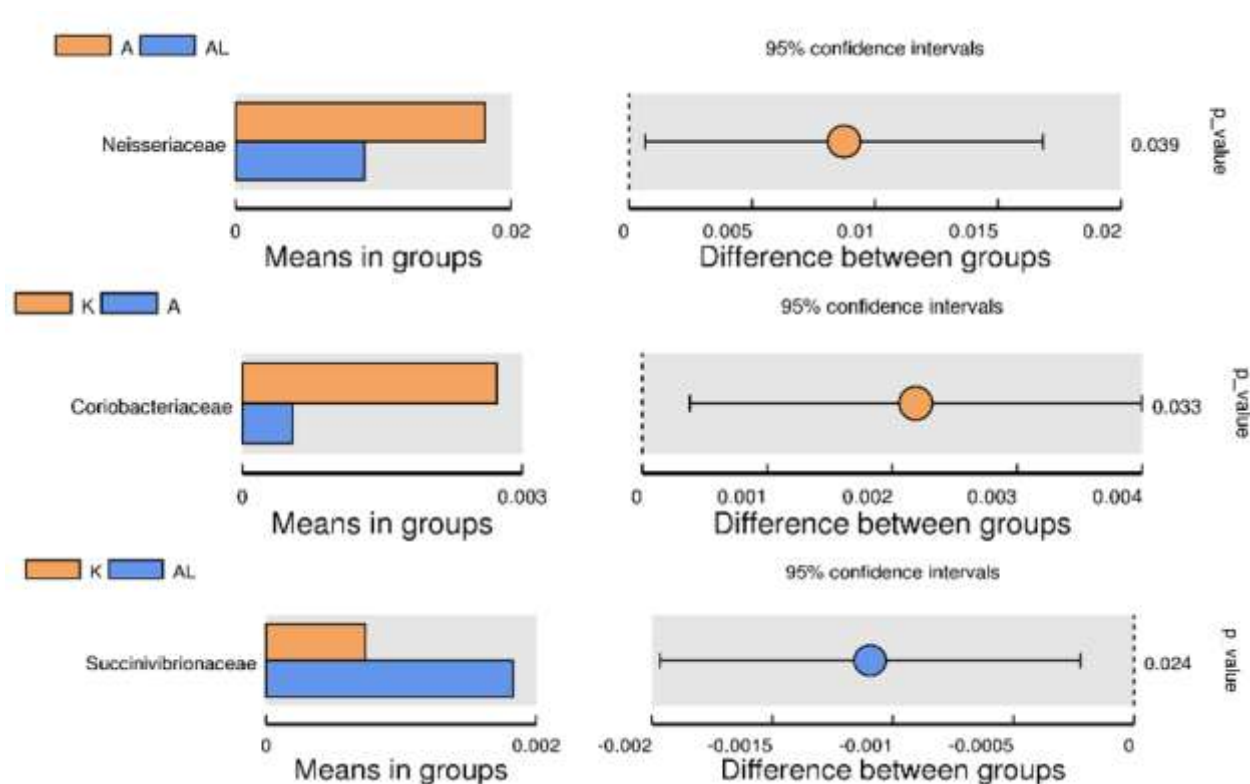


Рис. 6.11 Міжгруповий T-тестовий аналіз (родина Neisseriaceae, родина Coriobacteriaceae, родина Succivibrionaceae).

Рис. 6.11 візуалізує результати відносних кількісних показників у групах тварин К, А, та АL. Достовірне зниження рівня бактерій родини *Neisseriaceae* виявлено в групі АL порівняно з групою А, ймовірно, внаслідок антибактеріальної дії сполуки Les-6490. Проте рівень бактерій родини *Succivibrionaceae* у цій групі був вищим, ніж у контролі. Отже, виявлено зростання кількості коріобактерій як на рівні таксону Order, так і таксону Familia.

Міжгруповий t-тестовий аналіз таксонів рівня Genus (рід)

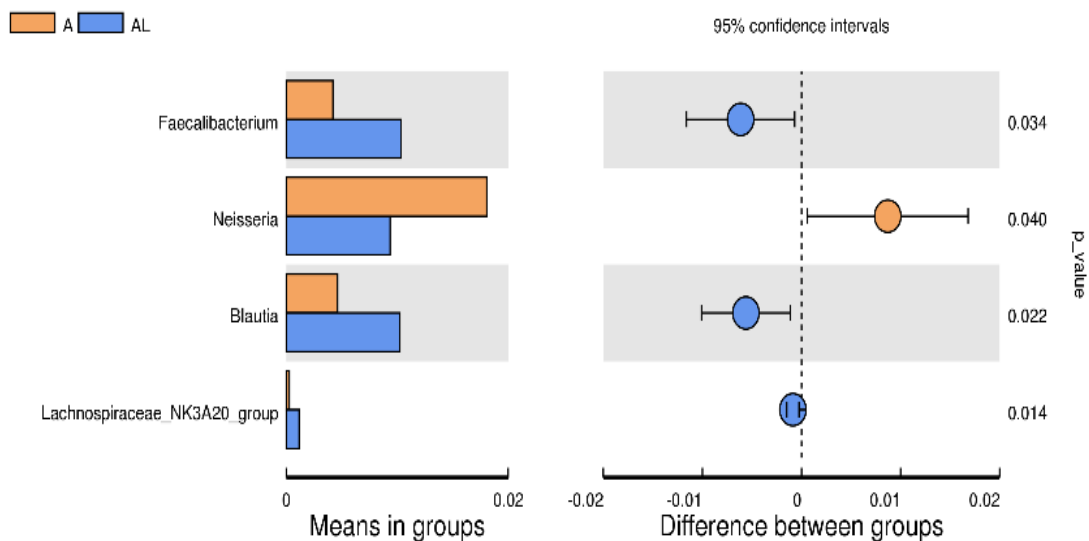


Рисунок 6.12 Міжгруповий T-тестовий аналіз (рід *Faecalibacterium*, рід *Neisseria*, рід *Blautia*, рід *Lachnospiraceae*).

Як показано на рис. 6.12 в групі AL виявлено значне збільшення кількості бактерій роду *Faecalibacterium*, з протизапальними властивостями, що зумовлює можливість їх використання як пробіотиків нового покоління. Одночасно в цій групі відмічено зменшення кількості бактерій роду *Neisseria*. Зазначено статистично вірогідне збільшення бактерій роду *Blautia* у групі AL у порівнянні з групою А. Бактерії цього роду продукують бутират і застосовувались як пробіотики. У групі AL кількість представників роду *Lachnospiraceae* значно зросла порівняно з контролем і групою А [145, 251].

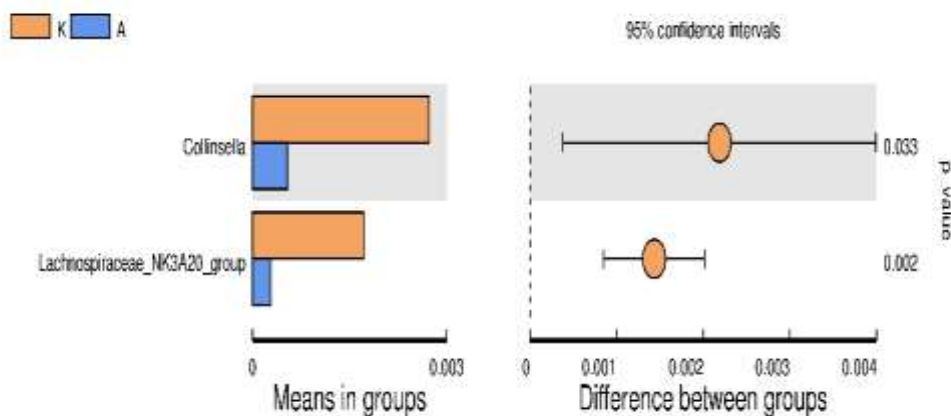


Рисунок 6.13 Міжгруповий t-тестовий аналіз (рід *Collinsella*, група NK3A20)

На рис 6.13 відображено результати порівняння відносного вмісту бактерій роду *Colinsella* і бактерій групи NK3A20 (родина *Lachnospiraceae*) у контрольній групі К і в групі А (індуковане ад'ювантом запалення).

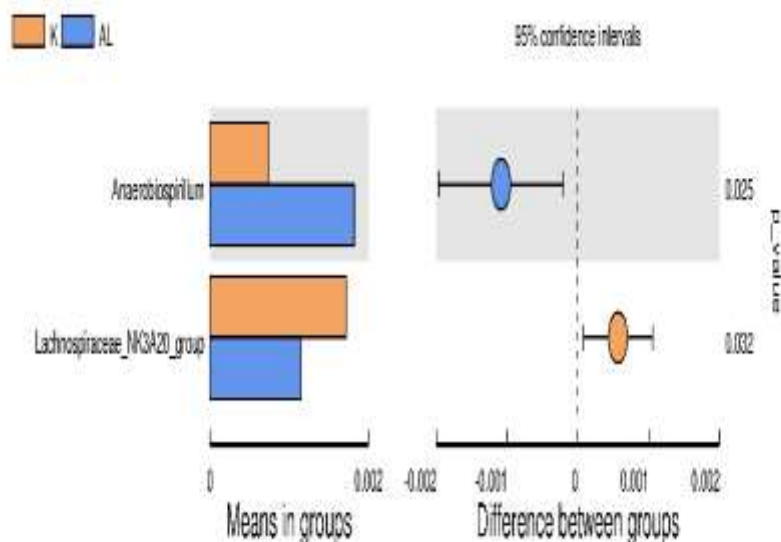


Рисунок 6.14 Міжгруповий t-тестовий аналіз – рід *Anaerobiospirillum* та група NK3A20

На 6.14 показано результати порівняння вмісту бактерій роду *Anaerobiospirillum* в групі AL, у якій застосовувалась сполука Les-6490 та в контрольній групі. Виявлено, що кількість прозапальних бактерій *Anaerobiospirillum* у групі AL був вищим, ніж у контролі. При цьому кількість бактерій NK3A20, навпаки виявилась вищою у контрольній групі. Вміст бактерії NK3A20 був значно вищим у контрольній групі, ніж у групі AL.

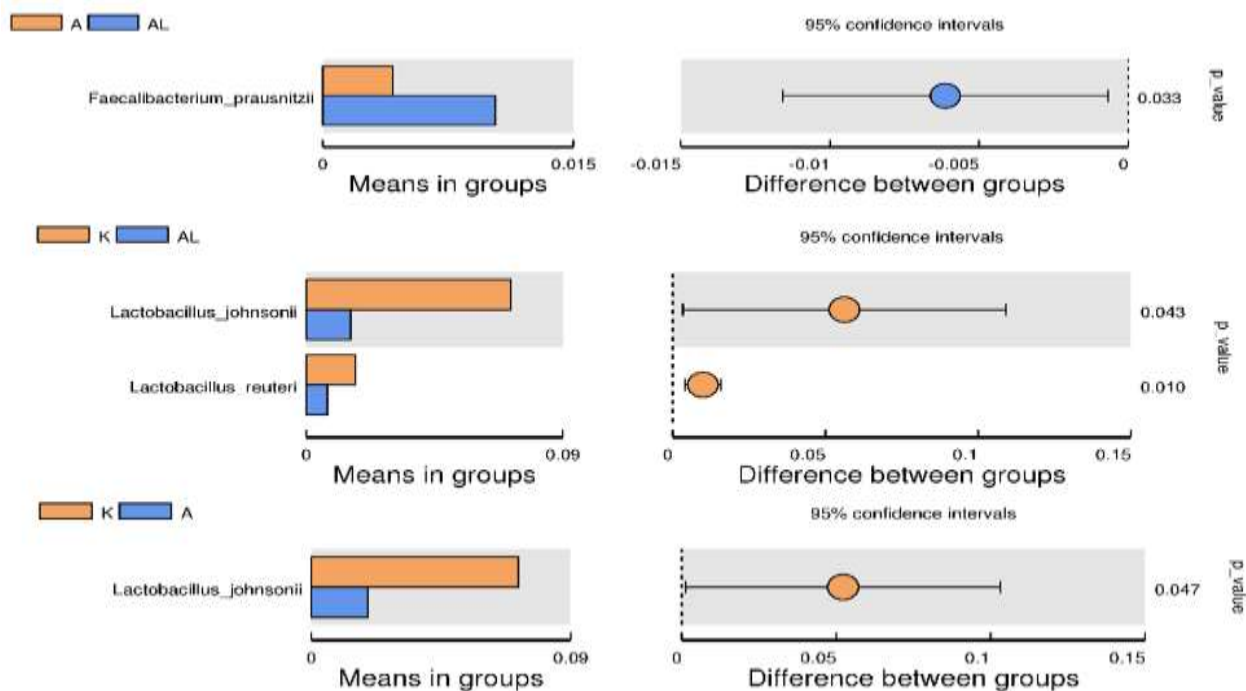


Рис. 6.15 Міжгруповий t-тестовий аналіз видів *Faecalibacterium prausnitzii*, потенційного пробіотика, види *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuter*.

На рис. 6.15 показано результати досліджень впливу сполуки Les-6490 на вміст окремих видів бактерій у кишковому каналі піддослідних тварин.

У групі AL відносна кількість бактерій виду *Faecalibacterium prausnitzii* (які мають протизапальну дію) була вищою ніж у групі А. Однак, виявилось що вміст лактобактерій видів *Lactobacillus johnsonii* та *Lactobacillus reuter* значно знижувався у групі AL порівняно з контролем, можливо, внаслідок пригнічення цих бактерій сполукою Les-6490, котра проявила антимікробну дію на деякі види грампозитивних бактерій [244].

6.4. MetaStat – аналіз таксонів із значними внутрішньогруповими варіаціями

При аналізі відносного вмісту бактерій роду *Collinsella* в групах K, A, AL виявлено значні варіації відносного вмісту окремих таксонів. Для виявлення статистичної достовірності різниці показників між такими групами використовують статистичний метод MetaStat на основі кількісних показників. Метод передбачає формулювання множинних гіпотез відмінностей ознак у малій вибірці – від нульової (відмінності немає) до максимальної (значні відмінності).

При математичній обробці таких моделей помилкові гіпотези відкидаються (метод FDR (false discovery rate) – коефіцієнт помилкового виявлення). На рис. 6.16 відображено результати метастат – аналізу відносного вмісту мікробіоти роду *Collinsella* та родини *Lachnospiraceae* в групах К, А, АL між якими не виявлено значущих відмінностей крім бактерій роду *Collinsella* для групи АL (коефіцієнт варіації $q < 0,05$).

На рис. 6.16 на осі X вказано назви таксонів, а на горизонтальній Y-осі відносна кількість таксонів у групі. Горизонтальні лінії розділяють групи із значними варіаціями *($q < 0,05$) значущі різниці, ** - дуже значущу різницю ($q < 0,01$).

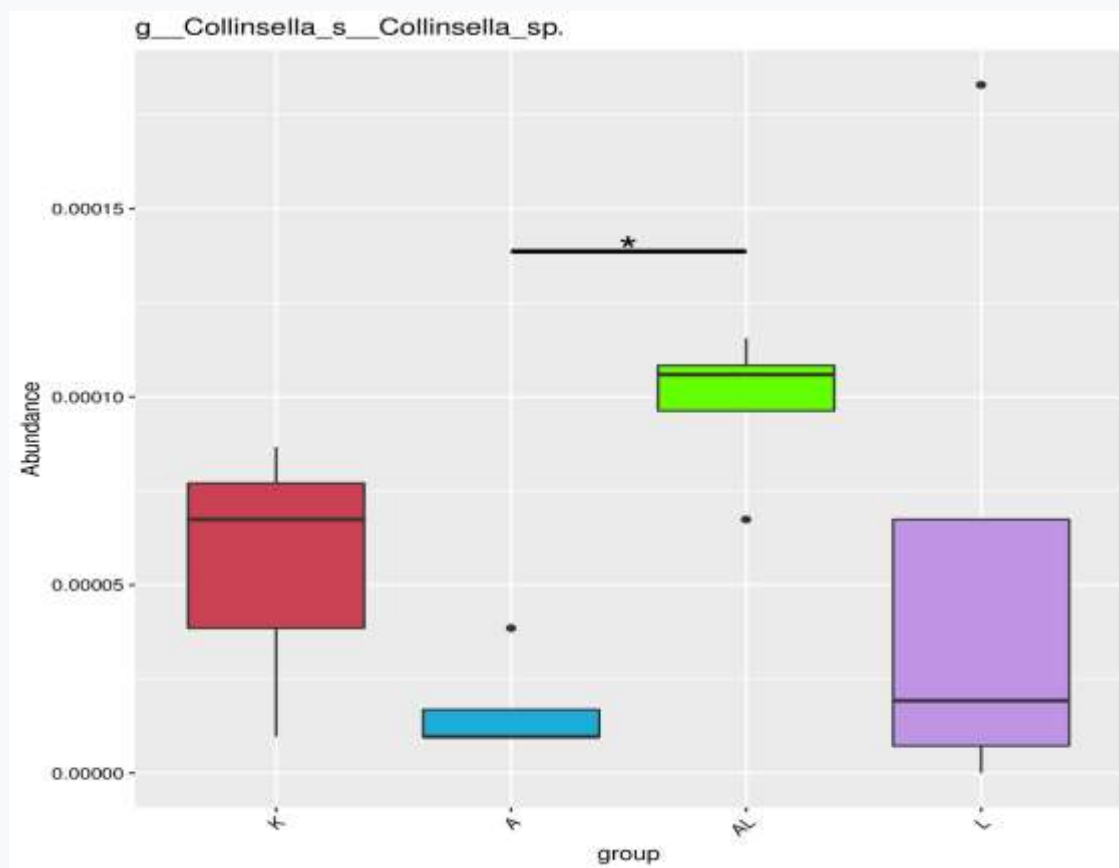


Рисунок 6.16 Результати мета-аналізу між групами.

Як видно з результатів, поданих на рис 6.13, виявлено значущу або дуже значущу різницю відносного вмісту бактерій мікробіому роду *Collinsella* та родини *Lachnospiraceae* між групами К, АL та L, що підтверджує достовірний рівень впливу сполуки на склад транзитної мікробіоти кишкового каналу щурів.

Висновки до розділу 6

1. Сполука Les-6490 на фоні індукованого запального процесу впливає на відносний рівень мікрофлори кишкового каналу щурів, підвищуючи показники таксонів з протизапальними властивостями – *Aeromonadales*, *Succivibrionaceae*, *Lachnospiraceae* NK3A20, порівняно з контролем. При цьому рівень *L. Johnsonii*, *L. Reuteri* знижувався. Показники прозапальних таксонів *Anaerobiospirillum* підвищувався, ймовірно, внаслідок взаємодії механізмів запалення, індукованого ад'ювантом Фрейнда, який включає бактерійний компонент та мікробного фактора вказаного таксону.
2. На фоні індукованого запального процесу сполука Les-6490 (група AL) впливала в бік підвищення, порівняно з групою А, відносного вмісту таксонів з протизапальною дією: *Coriobacteriales*, *F. Prausnitzii*, *Blautia*, *Collinsella*; при цьому відносний вміст прозапальних таксонів *Neisseria* знижувався.
3. У групі А з індукованим запаленням рівень таксонів з протизапальною дією був нижчим, ніж у контрольній групі (таксони *Coriobacteriales*, *Collinsella*, *Lachnospiraceae* NK3A20), що підтверджує припущення про взаємозв'язок між індукованим запаленням та протизапальними таксонами бактерій.

Матеріали до цього розділу висвітлені у рукописі [120].

РОЗДІЛ 7

ПОРІВНЯЛЬНА ДІЯ НІМЕСУЛІДУ ТА ПОХІДНОГО 4- ТІАЗОЛІДИНОНУ СПОЛУКИ LES-6490 НА ПАРИЄТАЛЬНУ МІКРОБІОТУ КИШКИ *IN VIVO* ПРИ ІНДУКОВАНОМУ ЗАПАЛЬНОМУ ПРОЦЕСІ

Вивчення впливу похідного 4-тіазолідинону та німесулід на мікробіоту кишки *in vivo* проводилося на біомоделі щурів. Тварини дослідної групи (n=30) при стандартному годуванні отримували німесулід (НПЗП) у дозі 15,0 мг/кг та похідного 4-тіазолідинону – Les-6490 (5-(Z)-((1,3-дифеніл-1H-піразол-4-іл)метилен)-2,4-тіазолідиндіон) у дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково один раз на добу впродовж 14 днів, після чого тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на фоні інгаляційного наркозу діетиловим ефіром. Перед введенням сполуки Les-6490 та німесулід розчиняли у Твін 80. Матеріалом для дослідження слугував пристінковий слиз тонкої кишки (пристінкова мікробіота) забраний в асептичних умовах.

7.1 Індекс охоплення на основі чисельності окремих видів

На діаграмі (рис.7.1) відображено альфа-різноманіття кишкового мікробіому за кількістю виявлених видів на основі індексу ACE – Abundance-based coverage estimators (індекс оцінки охоплення на основі чисельності). Результати досліджень вказують, що при індукованому запаленні (група А) спостерігається зменшення альфа-різноманітності кишкової мікробіоти в порівнянні з контролем, ймовірно внаслідок дії прозапальних цитокінів [9]. У групі AL під дією сполуки Les-6490 цей ефект знімається - альфа-різноманіття у цій групі вище, ніж у контролі. При цьому в групах N (німесулід) і L (Les-6490) відмічено деяке підвищення показника альфа-різноманітності.

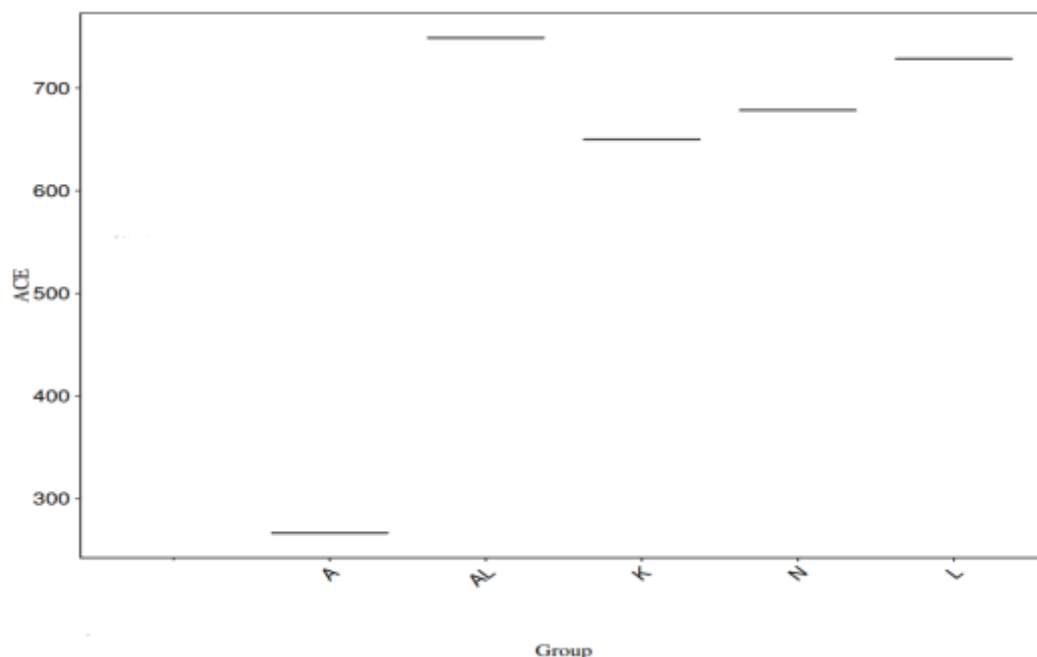


Рисунок 7.1 Результати індексу ACE альфа-різноманітності пристінкового мікробіому кишкового каналу

7.2 Дендрограма різноманіття мікробіомів стінки кишкового каналу на рівні типів та класів

Дендрограма різноманіття мікробіоти на рівні типів та класів (рис. 7.2.) візуалізує особливості, близькі до відзначених відмічені на рис. 7.1.

У групі А переважають Proteobacteria при значному зменшенні класу Firmicutes у порівнянні з контролем. При цьому показники груп А та AL близькі між собою, але відрізняються від контролю, що вказує на вплив запального процесу на пристінковий кишковий мікробіом. Найбільше альфа-різноманіття виявлено в групі L під дією сполуки Les-6490, тоді як німесулід проявив значно менший ефект (група N).

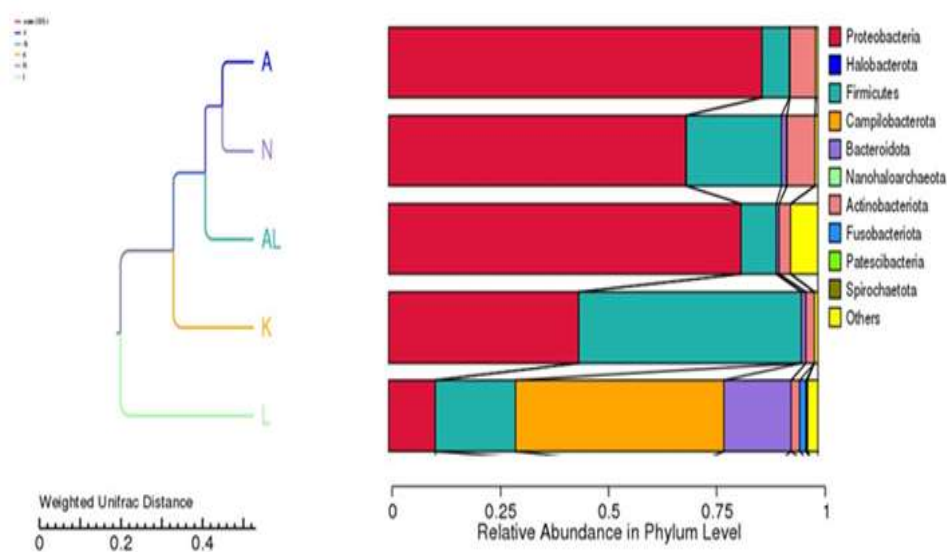


Рисунок 7.2 Результати видового різноманіття на рівнях типів і класів

7.3 Домінантні таксони в мікробіомах досліджуваних груп тварин.

Результати дослідження домінантних таксонів рівня окремих родів у пристінкових мікробіомах кишкового каналу щурів в умовах експерименту візуалізовано на рис. 7.3. Важливо, що при застосуванні вказаних праймерів ідентифіковано близько половини геномів.

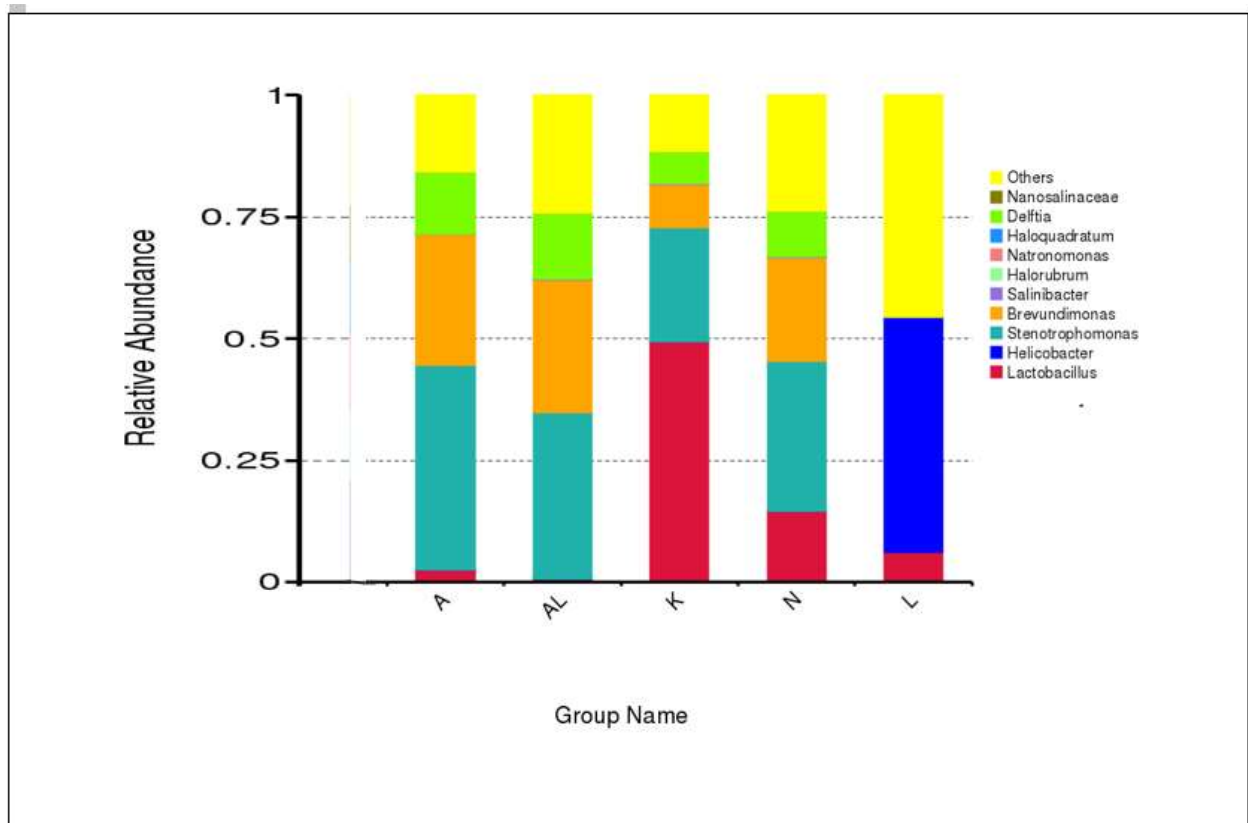


Рис. 7.3 Відносна чисельність домінантних таксонів пристінкового мікробіому

У контрольній групі ідентифіковано геноми чотирьох родів бактерій — у найбільшій кількості представників основного роду кишкового мікробіому *Lactobacillus*, а також роду *Stenotrophomonas* — слабоферментуючих грамнегативні бактерій, котрі виявляють у воді, ґрунті, на рослинах, а також можуть спричиняти опортуністичні нозокоміальні інфекції [35, 211]. Виявлено також геноми *Nitrosomonas* — аеробних бактерій здатних окислювати аміак і бактерій роду *Delftia* родини *Burkholderiaceae*, що виявляють у воді, ґрунті, кишковому каналі тварин і людей. Вони здатні метаболізувати різні речовини - ксенобіотики, і їх пропонують використовувати в системах біоочищення. Проте деякі варіанти мають фактори вірулентності і виділяються при опортуністичних захворюваннях у людей і тварин [90, 268].

У тварин з індукованим запаленням (групи А і AL), бактерії роду *Lactobacillus* не виявлялись або виявлялись у мінімальних кількостях.

Найбільші зміни мікробіому виявлено в групі L у тварин, що одержували сполуку Les-6490. Порівняно з контролем зменшувалась відносна кількість родів *Lactobacillus* та *Stenotrophomonas*. Проте в цій групі відмічено збільшення кількості *Helicobacter*, чого не спостерігається у інших досліджуваних групах. Види *Helicobacter* легко колонізують поверхню ШКТ завдяки мікроаерофільному метаболізму, спіралеподібній формі та особливій рухливості [227]. Залежно від їхнього розташування в шлунково-кишковій системі їх поділяють на шлункові гелікобактерії, такі як *Helicobacter pylori*, і кишково-печінкові гелікобактерії, які переважно колонізують кишечник і гепато-біліарну систему і відіграють захисну роль щодо розвитку певних аутоімунних процесів [196].

Крім того, *Helicobacter* може індукувати вироблення антибактеріальних пептидів, які протидіють потенційно шкідливим бактеріям [104, 263], або конкурують з бактеріями за ту саму екологічну нішу. У тварин цієї групи не виявляли бактерії роду *Delftia*. У тварин груп А, AL та N ці бактерії виявляли у приблизно однакових кількостях, хоча у більших кількостях, ніж у контрольній групі. Тому факт відсутності генетичних послідовностей цих бактерій у тварин, які одержували сполуку Les-6490 (група L) потребує додаткового вивчення.

Одержані результати вказують на альтерацію складу кишкового мікробіому тварин цієї групи. Склад пристінкового мікробіому групи N, тварини якої одержували німесулід, також характеризувався певними особливостями. Порівняно з контролем та групою L у кишковому мікробіомі цих тварин відмічено відносно меншу кількість лактобацил. У складі групи N, на відміну від групи L, домінували бактерії родів *Stenotrophomonas* та *Brevundimonas* яким властиво синтезувати каротиноїди, які можуть виступати як антиоксиданти, але їх дуже важко синтезувати хімічним шляхом [175, 242], проте їхня кількість істотно не відрізнялась від груп А та AL. Отже, досліджувана сполука Les-6490

та німесулід відрізнялись за впливом на склад пристінкового мікробіому щурів в умовах проведеного експерименту.

7.4 Відносна кількість таксонів пристінкових бактерій на рівні видів

Результати дослідження відносних кількостей таксонів бактерій на рівні видів показані на рис.7.4.

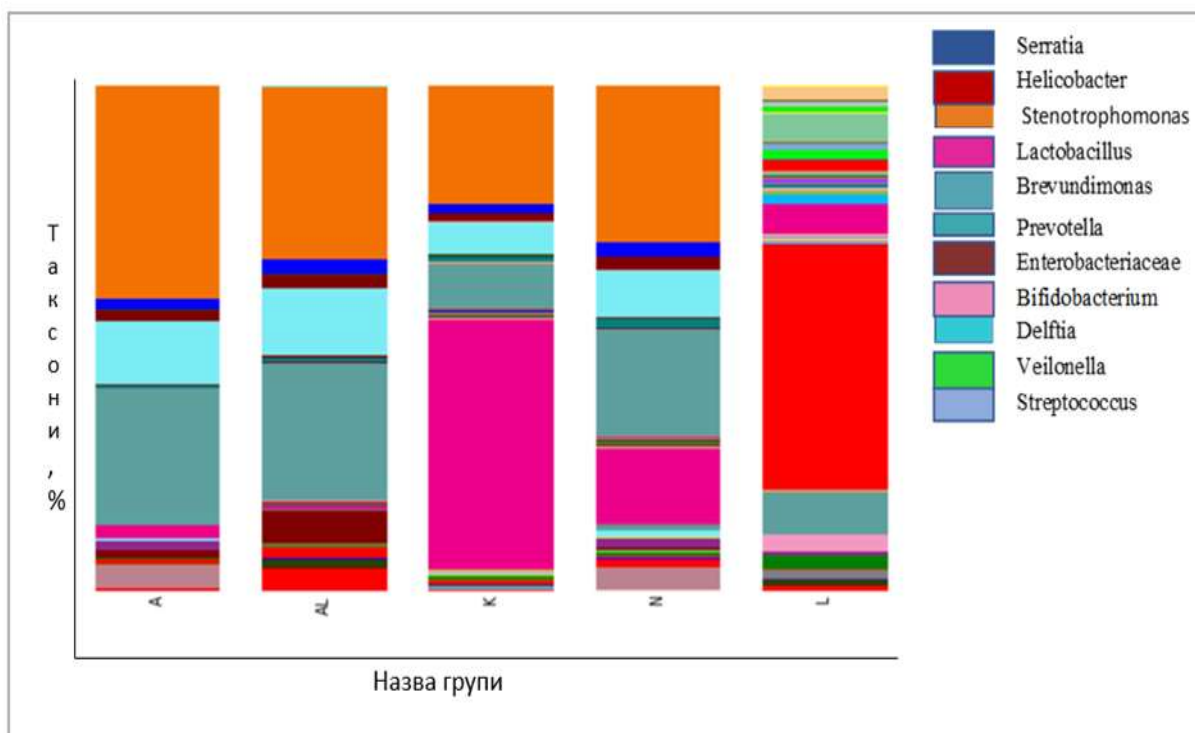


Рисунок 7.4 Видовий склад пристінкового кишкового мікробіому щурів.

При порівняльному аналізі цих результатів з попередніми (рис.7.3) треба брати до уваги, що до складу таксонів вищого порядку може входити різна кількість нижчих таксонів. Проте такі властивості мікробіоти як конкурентна здатність, продукція сигнальних молекул і факторів патогенності проявляються саме на рівні окремих видів чи варіантів одного виду мікроорганізмів. Результати візуалізації співвідношень між видами і родами в кишковому мікробіомі піддослідних тварин показали, що найбільше різноманіття виявлено в щурів групи L котрі одержували сполуку Les-6490 рис. 7.4. У цій групі виявлено бактерії роду *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Helicobacter*, які в інших

групах відсутні, або виявляли в дещо менших кількостях. Натомість у цій групі знижена кількість біфідобактерій і відсутні бактерії роду *Serratia*. У групі N, у порівнянні з групою L кількість біфідобактерій вища, але менша ніж у контролі. У групах тварин з індукованим запаленням кількість біфідобактерій також значно нижча ніж у контролі та в групі N. Слід взяти до уваги, що біфідобактерії розглядаються та використовуються як пробіотики, які мають властивість пригнічувати ріст патогенних бактерій та регулювати імунну відповідь.

Відсотковий вміст мікроорганізмів пристінкової мікрофлори щурів візуалізовано на рис.7.5 та 7.6.

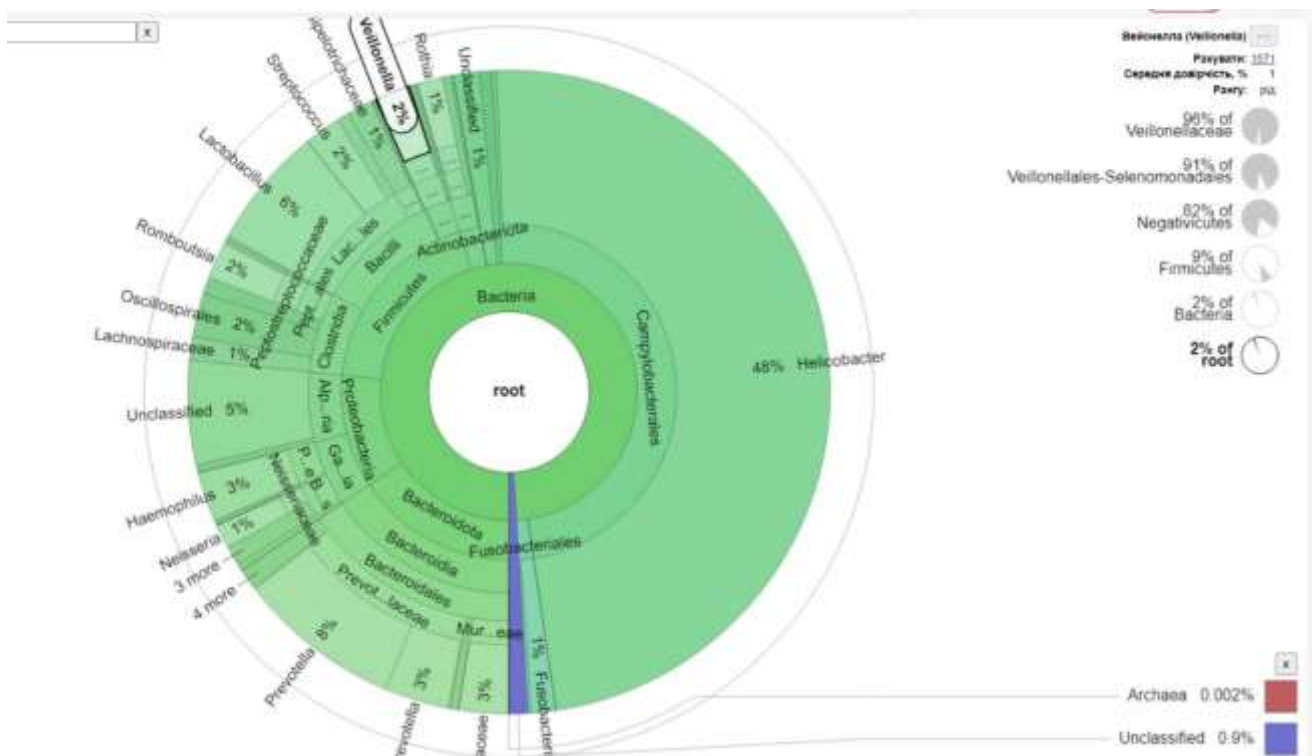


Рис. 7.5 Біорізноманіття пристінкової мікрофлори щурів за дії сполуки Les-6490

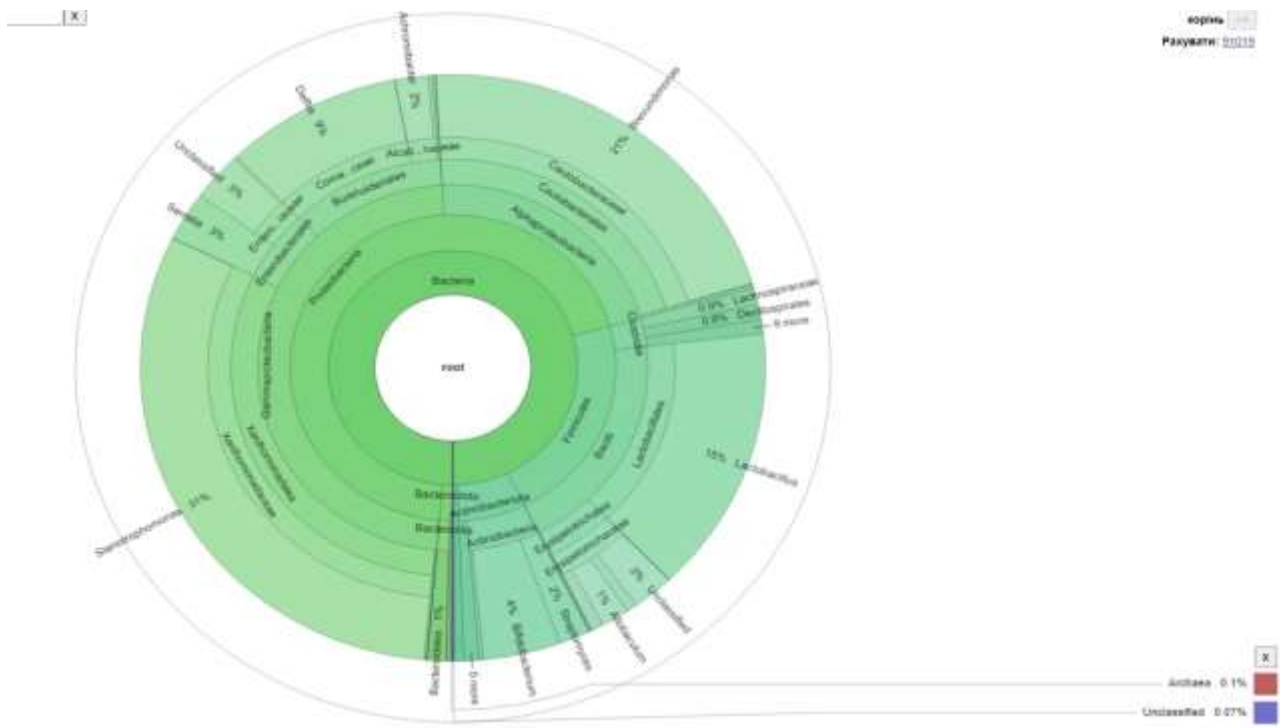


Рис.7.6 Біорізноманіття пристінкової мікрофлори щурів за дії німесуліді.

Таким чином, ці дослідження показують, що при індукованому запальному процесі, а також при запаленні на фоні введення сполуки Les-6490, розвиваються зміни компонентів пристінкового мікробіому кишкового каналу. Але найбільш виразні зміни виявлено у тварин під впливом новосинтезованої речовини Les- 6490 та частково при дії німесуліді.

Висновки до розділу 7

1. Склад мікробіомів кишкового тракту змінюється в умовах індукованого запалення та при дії новосинтезованої сполуки Les-6490 у порівнянні з групою контролю.
2. Сполука Les-6490 впливає на склад мікробіомів кишкового каналу щурів подібно до НПЗП німесуліді, але така дія проявляється більш виразно.
3. Сполука Les-6490 потенціює ріст *Helicobacter*, але пригнічує *Stenotrophomonas* і в цілому сприяє розвитку більшої видової різноманітності мікробіому кишки.

Матеріали до цього розділу висвітлені у статті [210].

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Відповідно до мети, об'єкту та предмету досліджень ми вивчали новосинтезовану сполуку – похідну 4-тіазолідинону - Les-6490. У гострому експерименті на щурах передбачалось дослідження гострої токсичності, гематологічних та біохімічних показників крові, впливу на мікрофлору кишкового каналу та на розвиток індукованого запального процесу.

Дослідження антимікробних властивостей сполук похідних 4-тіазолідинонів: молекулярно-генетичними методами, на основі аналізу продуктів секвенування 16S рРНК, досліджувалась альтерація таксонів мікрофлори просвіту кишки та пристінкової мікрофлори слизової кишкового каналу. Як препарат порівняння вибрано нестероїдний протизапальний засіб — німесулід. Вибір цього препарату ґрунтувався на відповідності термінів його клінічного застосування до умов тривалості гострого експериментального дослідження сполуки Les-6490. Відповідно до плану експерименту, була виділена контрольна група тварин та експериментальні групи: із індукованим запальним процесом та групи, в яких ад'ювант не застосовувався.

Групи позначено символами: К – контроль, А – група з індукованим запаленням, L – група, що одержувала сполуку Les-6490, N – група під дією німесуліду та групи AL і AN, які, відповідно, одержували речовини на фоні індукованого запалення.

Застосовано наступні методи дослідження: мікробіологічний із використанням мікроскопічних, культурологічних методик та способів оцінювання антимікробної дії; гематологічні та біохімічні для оцінювання впливу досліджуваних сполук на показники крові, функції печінки та мінеральний обмін; методи геноміки з визначенням альфа- та бета-різноманітності та інших показників, що вказують на альтерацію мікробіомів. Для статистичної обробки результатів використовували методи, що застосовуються в мікробіологічній екології.

При дослідженні гострої токсичності новосинтезованої сполуки на мишах було встановлено середню 50% смертельну дозу (ЛД₅₀). Результати показали, що ЛД₅₀ сполуки для мишей, становить $910,0 \pm 57,0$ мг/кг, тобто є відносно низькою токсичною в гострому досліді, що дає підставу віднести сполуку Les-6490 до 4-го класу токсичності, отже, вона придатна до експериментальних досліджень на тваринах. Похідні 4-тіазолідинону мають широкий спектр біологічної активності, до основних належить протизапальна дія, яку вивчали у ряді досліджень [21, 162].

В основному досліді вивчалась протизапальна дія Les-6490 у порівнянні з німесулідом. Запальний процес індукувався повним ад'ювантом Фрейнда до складу якого входять інактивовані мікобактерії VCG. Вибір цього ад'юванту зумовлений тим, що нестероїдні протизапальні препарати діють переважно на клітинні механізми імунних захисних чи імунопатологічних реакцій, а саме такий механізм властивий основному компоненту ад'юванта [36, 72].

Розвиток місцевого запального процесу оцінювали візуально в балах та за окружністю запаленої стопи тварин. Результати досліджень показали, що німесулід та сполука Les-6490 сповільнювали розвиток запального процесу порівняно з тваринами, які не одержували цих речовин, це проявлялось у затримці розвитку клінічних проявів запального процесу: чітко виражені ознаки запалення включно із набряковою реакцією тканин стопи в контролі розвивались на 2-3 дні раніше ніж при дії німесуліду та на 3-4 дні раніше при дії сполуки Les- 6490.

Отже, досліджувана новосинтезована сполука проявляла більш значну протизапальну дію.

У ході цього експерименту ми вивчали гематологічні показники у піддослідних тварин, які б свідчили про можливі протизапальні властивості та токсичну дію досліджуваної сполуки в порівнянні з препаратом порівняння — німесулідом.

Під час аналізу отриманих результатів цього експерименту слід зауважити, що індуковане запалення призвело до розвитку лейкоцитозу (збільшення рівня

лейкоцитів в 1,7 раза порівняно з контролем), а також наростанням ШОЕ у 2,7 раза. При дії сполуки Les-6490 і німесуліді показники кількості лейкоцитів та ШОЕ зменшувались до рівня контролю. Деяке зменшення кількості еритроцитів не перевищувало меж статистичної похибки, але відмічено тенденцію до зменшення кількості еритроцитів у тварин з індукованим запаленням та нормалізацію цих показників під дією досліджуваних препаратів, проте ці зміни статистично не достовірні.

При певних умовах побічна дія НПЗП може проявлятися як лейкопенія, тромбоцитопенія, порушення гемостазу, гемолітична анемія [17]. Виходячи з цього в нашому експерименті досліджувалась формула крові.

При дослідженні лейкоцитарної формули виявлено, що під впливом досліджуваних речовин кількість нейтрофілів зменшилась в 1,4 раза порівняно з контрольною групою, а при наявності індукованого запалення їх кількість збільшилась в 1,5 раза. Проте, при дії досліджуваних сполук кількість нейтрофілів достовірно знижувалась, хоча й перевищувала рівень контролю.

Отже, протизапальна дія досліджуваних речовин проявилась у зменшенні лейкоцитів до рівня контролю, проте не виявлено достовірної різниці між дією німесуліді та при дії досліджуваних речовин. Кількість нейтрофілів зменшувалась у 1,5 раза під дією німесуліді. Ймовірно, що нейтрофільний лейкоцитоз є реакцією на гостре запалення, спричинене ад'ювантом, котрий містить бактеріальний компонент, а ця реакція пригнічується німесулідом як протизапальним препаратом. Оскільки сполука Les-6490 проявила аналогічну дію, то це вказує на її протизапальні властивості.

При дослідженні біохімічних показників крові встановлено, що при запальному процесі у щурів не виявляються зміни вмісту загального протеїну, концентрації сечовини та креатиніну порівняно з контролем, але знижується рівень альбуміну. Досліджувана сполука Les-6490 не спричиняла виражених змін біохімічних показників крові, тоді як препарат порівняння, викликав зниження рівня білка, альбуміну та сечовини. Отже, сполука Les-6490 проявила

ознаки протизапальної дії в гострому експерименті, не впливаючи на біохімічні показники крові.

Зміни у рівнях аспартатамінотрансферази (АсАТ) в сироватці крові вказують на внутрішньоклітинні пошкодження кардіоміоцитів, що часто спостерігається при кардіопатіях. Підвищення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) є індикатором ряду захворювань, зокрема печінкового походження. Коефіцієнт де Рітіса (відношення АсАТ до АлАТ) є важливим аналітичним показником для оцінки змін активності обох трансаміназ при різних патологічних станах, що пов'язані з ураженням серця або печінки, підвищення якого може вказувати на м'язове походження [180] .

Виявилось, що показники активності ферментів знижувались в тварин з індукованим запаленням, а також у групах, яким вводились досліджувані речовини, особливо німесулід. Зниження активності ферментів виявлено також у групах тварин, яким досліджувані сполуки вводили на фоні індукованого запалення. Зниження активності ферментів можливе внаслідок ферментів м'язового походження, які знижуються при зменшенні фізичної активності тварини із запальним процесом кінцівки або/та внаслідок дії речовин як анальгетиків. Отже, в ході експерименту не виявлено ознак гепатотоксичної дії сполуки Les-6490 та німесуліду, яка б проявилась підвищенням активності ферментів.

При дослідженні рівня холестеролу та тригліцеридів виявлено зниження вмісту показників ліпідного обміну у всіх групах тварин у порівнянні з контролем. Особливо чітко знижувались ці показники в групі тварин, що одержували сполуку Les-6490 на фоні запального процесу (зниження в 2,6 раза). На нашу думку, виявлений вплив новосинтезованої похідної 4-тіазолідинону потребує подальшого вивчення.

НПЗП як інгібітори ЦОГ та простагландинів впливають на мінеральний обмін [275].

У нашому дослідженні виявлено зниження кількості неорганічних фосфатів та кальцій-іонів на тлі запального процесу. Досліджувані речовини

дещо зменшували показники порушень мінерального обміну; цей ефект більш виражений при дії на тварини сполуки Les-6490.

Таким чином, нами було проведено порівняльний вплив селективного інгібітора ЦОГ-2 – німесулідю та новосинтезованої сполуки Les-6490 на показники ліпідного і фосфорно-кальцієвого обміну та визначено маркери гепатотоксичності як при самостійному введенні сполук, так і при їх застосуванні на тлі індукованого запалення.

Досліджувану сполуку можна вважати перспективною для подальших досліджень як речовину з протизапальною дією.

При скринінгу 22 похідних 4-тіазолідинонів сполука Les-6490 виявила антимікробні властивості. Тому нашим завданням було вивчити антимікробну дію сполуки Les-6490 *in vitro* та в експерименті на тваринах. Як тест-мікроорганізми використано музейні штами та клінічні ізоляти грамнегативних бактерії-грацілікүтів класу γ - протеобактерій, родини Enterobacteriaceae: *Proteus vulgaris* №152, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* 189, *Raoultella terrigena* ATCC 33257, а також представник родини Vibrionaceae, роду *Aeromonas* — *Aeromonas hydrophila* N196. Також вивчено дію сполуки Les-6490 на грампозитивні бактерії-фірмікути — *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, резистентний до пеніцилінів), *Staphylococcus aureus* N239, *Lactobacillus fermentum* (пробіотичний штама). Протигрибкова дія сполуки Les-6490 досліджена щодо одноклітинних грибів *Candida albicans* ATCC 885-653, *Candida albicans* N679, *Saccharomyces cerevisiae* N62. За патогенними характеристиками ці тестові мікроорганізми можна віднести до патогенних, умовно-патогенних та бактерій з пробіотичними властивостями. Ймовірний ефект сполуки Les-6490 щодо бактерії порівнювався з антибіотиком вузького спектра — ванкоміцином (дія переважно на грампозитивні бактерії) та з антибіотиком широкого спектра — ципрофлоксацином. Протигрибковий ефект сполуки Les-6490 вивчався у порівнянні з клортимазолом.

У результаті досліджень виявлено, що досліджувана сполука Les-6490 проявила помірну активність щодо музейних штамів *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis*. При цьому антибактеріальна активність була в 2,5 рази нижчою, ніж у стандартного препарату ципрофлоксацину. Клінічний ізолят *Staphylococcus aureus*, стійкий до ванкоміцину, виявився стійким і до сполуки Les-6490, що може вказувати на подібні механізми резистентності стафілокока до антимікробних препаратів. Важливо, що грампозитивні бактерії *Lactobacillus fermentum* також виявились стійкими до сполуки Les-6490. Це може свідчити про низький вплив сполуки на непатогенну мікробіоту. *L. Fermentum* — це вид молочнокислих бактерій, які зазвичай зустрічаються в бродильних рослинах і молочних продуктах, а також у шлунково-кишковому тракті та ротовій порожнині людини. Він відомий своїми пробіотичними властивостями, сприяючи здоров'ю мікробіому кишечника, ферментуючи вуглеводи та виробляючи молочну кислоту. *L. Fermentum* може приносити користь господарю, покращуючи здоров'я кишечника та потенційно зміцнювати імунну систему. Дослідження щодо його користі для здоров'я тривають, особливо щодо застосування в пробіотичних добавках і в харчових продуктах [137].

Досліджений нами новосинтезований похідний 4-тіазолідинону не виявив активності щодо досліджених бактерій класу γ - протеобактерій, чутливих до ципрофлоксацину. Сполука затримувала ріст музейного штаму *C. albicans* (ATCC 885-653) - (МІК становила 760 $\mu\text{M}/\text{л}$); *C. albicans* N67 (МІК становила - 790 $\mu\text{M}/\text{л}$); *Saccharomyces cerevisiae* N62 - 820 $\mu\text{M}/\text{л}$, тоді як клортимазол затримував ріст цих штамів при близьких значеннях МІК - 720, 700 і 820 $\mu\text{M}/\text{л}$ відповідно. Отже, протигрибкова активність сполуки Les-6490 була вищою, ніж антибактеріальна.

Важливо, що застосований у наших дослідженнях препарат порівняння — німесулід, також виявляв протигрибкову дію при співрозмірних значеннях МІК [52], а клінічно виражений лікувальний ефект при комбінованому застосуванні з цефазоліном залежав від пригнічення прозапальних цитокінів [194].

Найчастішими проявами побічної дії НПЗП є ураження шлунково-кишкового каналу. Ураження ШКТ відмічається на всіх його відділах. У шлунку, як ускладнення НПЗП терапії, зазначено утворення виразок з кровотечею та перфорацією стінки. Ураження тонкої та товстої кишки проявляються різними проявами ентеропатії. У багатьох дослідженнях вказується, що кишкову мікробіоту слід зарахувати до визначальних факторів, що впливають на здоров'я як на регіональному, так і на глобальному рівнях [107].

При вивченні механізму дії кишкової мікробіоти як в біотопі кишкового каналу, так і впливі на організм господаря у цілому як у тварин, так і в людини встановлено що кількість мікроорганізмів у кишковому каналі становить порядку $3,8 \times 10^{13}$, тобто є співрозмірна, або навіть переважає кількість клітин організму людини. А кількість генів мікроорганізмів у 150 разів перевищує кількість генів у генетичному апараті людини. До складу мікробіому входять геноми мікроорганізмів, які можна дослідити традиційними методами, а також ті, які виявляються тільки при метагеномних дослідженнях [113, 217].

У НПЗП виявлені антимікробні властивості, проте у звичайних терапевтичних дозах вони не мають переваг перед іншими антимікробними препаратами за спектром дії так і за мінімальною антимікробною концентрацією. Побічні ефекти НПЗП опосередковуються через вплив на кишкову мікробіоту.

Кишковий мікробіом має властивості та функції відкритої системи, котра бере участь у забезпеченні енергетичного балансу організму, регуляційних механізмах гомеостазу завдяки продукції метаболічних та сигнальних сполук. При взаємодії мікробіоти кишкового каналу з мукозоасоційованою тканиною стінки кишкового каналу забезпечується розвиток імунної толерантності до антигенів мікроорганізмів та нутрієнтів. При метаболізмі мікроорганізмами харчових волокон синтезуються коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) як важливі енергетичні компоненти для ентероцитів кишкової стінки. КЛЖК – бутират, сукцинат та ін. – виконують функцію взаємодії в каналах зв'язку кишковий канал – печінка – головний мозок. Порушення співвідношень між окремими компонентами мікробіому (при переважанні видів бактерій з

прозапальними властивостями) можуть спровокувати розвиток системних або локальних автоімунних процесів – ревматоїдного артриту, хвороби Крона, целиакії тощо. За даним досліджень простежується залежність складу мікробіому за показниками альфа- і бета- різноманітності залежно від віку, екологічних та соціальних умов проживання, вживання антибіотиків та інших препаратів з протимікробними властивостями [7, 8].

У дослідженнях останніх років обґрунтовано концепцію One Health – «єдине здоров'я», яка розглядає мікробіоту та генетичні елементи людини і тварин, а також зовнішнього середовища як єдине ціле, а організм людини в такому середовищі – як голобіонт – систему, що включає організм людини, мікрофлору тварин і зовнішнього середовища [253]. Тому зміни мікробіому відносять до побічних небажаних ефектів НПЗП.

З метою пошуку речовин, які б проявляли бажані біологічні та лікувальні властивості з мінімальним побічним впливом, постійно ведеться синтез нових сполук. Одну з найважливіших сполук — 1,3 тiazолідин-4-он, називають «магічною молекулою», оскільки її похідні мають широкий спектр біологічної активності, проявляючи протипухлинну, антибактеріальну, противірусну та антипротизойну дію. Вони спричиняють також протисудомну, анальгетичну протизапальну та антипіретичну дію. У ряді робіт опубліковані результати досліджень про вплив похідних 4-тіазолідинонів на мікрофлору кишкового каналу [1, 114, 132, 277].

В експерименті на щурах було показано, що похідна сполука 4- тіазолідинонів – метформін, нормалізує мікрофлору кишкового каналу щурів з переважанням роду *Lactobacillus*. Метформін сприяє розвитку бактерій – продуцентів коротколавнцюгових жирних кислот, зокрема родин *Blautia*, *Bacteroides*, *Butyricoccus* та *Phascolarctobacterium*, що відносяться до типу *Proteobacteria*, а також родів *Allobaculum* і *Lactobacillus*.

При аналізі результатів опублікованих робіт щодо впливу похідних 4- тіазолідинону на кишкову мікрофлору можна зробити висновок, що

альтерація мікробіоти розвивається унаслідок опосередкованої дії препаратів на механізми, котрі регулюють стабільність цієї екосистеми.

З урахуванням вказаної інформації та результатів дослідження впливу антимікробної дії сполуки Les-6490 *in vitro* ми спланували і провели порівняльне дослідження дії цієї сполуки та німесулід у експерименті на щурах на фоні індукованого ад'ювантом запалення. Результати досліджень показали, що сполука Les-6490 і німесулід істотно змінюють мікробіоту кишкового каналу щурів при короткочасному впливі. У порівнянні з контролем кількість γ -протеобактерій знижувалась на 1-2 логарифми у групах, що одержували німесулід або сполуки Les-6490, хоча *in vitro* такої дії новосинтезованої сполуки не відмічено. Одночасно виявлено вищий рівень ентерококів - збільшення на 2 логарифми та клостридій (збільшення на 1 логарифм) - у групах тварин, що одержували німесулід або сполуку Les-6490. Але кількість лактобактерій зменшувалась при дії сполуки Les-6490 у 5 разів (0,5 логарифма), а при дії німесулід відмічено зменшення у 2,8 логарифма. Ми зазначили особливість впливу сполуки Les-6490 на рівень бактерій класу Actinobacteria – біфідобактерій, а саме: кількість цих бактерій збільшилась у 24-26 раз у порівнянні з контролем. Оскільки біфідобактерії зараховують до пробіотичних мікроорганізмів, збільшення їх кількості вказує на можливий позитивний вплив сполуки Les-6490 на мікробіоту кишкового каналу.

Аналіз наукових повідомлень у цьому напрямку показує, що традиційні мікробіологічні методи, попри їхню значущість, особливо в клініко-мікробіологічних дослідженнях доповнюються методами метагеноміки.

У наших дослідженнях застосовано вивчення геномного складу кишкового мікробіому методом секвенування 16S рРНК з визначенням – операційних таксономічних одиниць. Це дало змогу виявити та кластеризувати подібні варіанти та виділити окремі таксономічні одиниці виду та роду бактерій.

На першому етапі особливості складу мікробіомів піддослідних тварин виявлено на рівні високих таксонів (Phylum - тип). З виявлених 29 відібрано 10 таксонів різних рангів. Встановлено, що мікробіом групи, котра одержувала

сполуку Les-6490, значно відрізняється від мікробіомів інших груп за рахунок високого вмісту бактерій роду *Helicobacter*. Слід зазначити, що бактерії роду *Helicobacter* поширені серед різних видів ссавців, зокрема у лабораторних щурів [97].

У цій групі також значно знижений рівень бактерій, характерних для кишкового каналу гризунів, котрі беруть участь у продукції КЛЖК - бутирату (родина Muribaculacea) [97].

У цій групі також значно знижений рівень бактерій, характерних для кишкового каналу гризунів, котрі беруть участь у продукції КЛЖК - бутирату (родина Muribaculacea) [222].

Важливо, що в групах AL і L, котрі одержували сполуку Les-6490 не виявляються прокаріоти роду *Treponema*, що може вказувати на протитрепонемну дію цієї сполуки. Механізм антитрепонемної дії сполуки може бути пов'язаний з непрямим антимікробним ефектом, зумовленим конкуренцією в біоніші та продукцією бактеріоцинів пробіотичними штамми, кількість яких значно зросла, наприклад, антагонізм між видами *Bifidobacterium*, відомими пробіотиками та біоконсервантами та *Treponema spp.* [24].

Кишкове мікробне різноманіття та запалення тісно пов'язані. Різноманітний мікробіом кишечника, як правило, пов'язаний з хорошим здоров'ям, включаючи імунну систему, яка добре функціонує [170].

З іншого боку, зменшення мікробного різноманіття в кишечнику пов'язане з різними запальними станами, такими як запальні захворювання кишечника (ЗЗК), ожиріння і навіть розлади психічного здоров'я [81].

Різноманітний мікробіом регулює імунну систему, допомагає підтримувати цілісність кишкового бар'єру та виробляє метаболіти, які можуть мати протизапальну дію. І навпаки, менш різноманітний мікробіом кишечника може призвести до надмірно активної імунної відповіді та хронічного запалення. Досліджувана сполука призводить до збільшення мікробного різноманіття, що може пояснити її протизапальну дію та позитивний вплив на відновлення мікробіоти кишечника.

Для аналізу різноманітності кишкової мікробіоти застосовують альфа- і бета- різноманітності з використанням методів геноміки. Альфа-різноманітність відображає склад та взаємовідношення окремих видів мікроорганізмів в конкретному біотопі на основі аналізу OTU. Цей підхід потребує поєднання різних статистичних методів: визначення кривої біорізноманіття, індексів ACE, графіків «цілого дерева». Крива біорізноманіття відображає приріст таксонів в міру глибини зчитування OTU, тобто врахування таксонів, які містились в досліджуваній пробі в мінімальних кількостях, а це відображає ступінь альфа-біорізноманіття. За цим показником найбільше альфа-різноманіття виявлено в групі L, тварини котрої одержували сполуку Les-6490. Аналогічні результати одержані при застосуванні індексу ACE – Abundance-based coverage estimators (індекс оцінки охоплення на основі чисельності) з побудовою «коробкових» діаграм. Діаграма, що відповідає групі L, значно відрізняється від діаграм інших груп, що вказує на більше альфа-різноманіття OTU (геномів мікроорганізмів). Спосіб статистичного дослідження phylogenetic diversity whole tree (PD whole tree – філогенетичне різноманіття «цілого дерева») застосовується для дослідження альфа-різноманітності на основі виявлення філогенетично споріднених таксонів. За цим показником також виділяється група L, тобто у цій групі виявлено найбільше споріднених таксонів. Проведені дослідження показують, що введення сполуки сприяє збільшенню біорізноманіття в досліджуваному біотопі.

Бета-різноманіття досліджується при порівнянні особливостей складу мікроорганізмів у різних біотопах та порівнянні біорізноманіття при дії різних факторів. Для порівняння складу мікробіомів між парами зразків біоматеріалу застосовний метод розрахунку квадратних матриць незбіжностей.

Виявлена достовірна різниця показників між контрольною групою та групами, котрим вводився Les-6490. Тобто, ця сполука спричиняє односпрямовану дію на інтестинальний мікробіом у тварин з індукованим запаленням, а також при відсутності запального процесу. При аналізі головних компонентів мікробіому з кластерним перетворенням (PCA) виявлено що

достовірні розбіжності складу мікробіомів виявлені в групі L, проте при індукованому запалення (група AL) бета-різноманітність зменшувалась.

Для дослідження біорізноманітності об'єктів з дискретними характеристиками, до яких належить мікрофлора, застосовують метод несиметричного багатовимірного шкалювання – NDMS. Результати цього аналізу в основному збігаються методом PCA – сполука Les-6490 сприяє збільшенню бета-різноманітності, котре гальмується внаслідок розвитку запального процесу. Аналогічні результати одержано при застосуванні процедури перестановки з кількома відповідями (MRPP). Аналіз MRPP продемонстрував значний ($p < 0,05$) вплив сполуки Les-6490 на розподіл мікробіоти в групах A–AL ($p=0,048$), AL–L ($p=0,034$), A–L ($p= 0,035$) та K–L ($p=0,03$).

Таким чином, проведений аналіз результатів дослідження альфа- і бета-різноманітності свідчить про позитивний вплив новосинтезованої сполуки Les-6490 на кишкову мікрофлору піддослідних щурів.

Стан біорізноманітності кишкового мікробіому може вказувати на ризики захворювань, пов'язаних з мікробіотою кишкового каналу. Але такі ризики опосередковуються через певні таксони мікрофлори, інтегральною характеристикою яких є протизапальна чи прозапальна дія. Виходячи з цього ми проаналізували склад таксонів різного рівня в піддослідних групах тварин. На рівні вищих таксонів Filum (тип) у досліджуваних тварин виявлено Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Pseudomonadota до яких відносяться класи Lactobacillium, Clostridium, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria. До цих класів відносяться таксони рівня «Order» - (порядок – Coriobacteriales, Eubacteriales, Neisseriales, Aeromonadales, Lactobacillales і Familia (родина) *Neisseriaceae*, *Succinivibrionaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Collinsellaceae*, *Lactobacillaceae*.

Метод 16S рРНК не є оптимальним для видової ідентифікації мікроорганізмів, але придатний для ідентифікації роду. Однак у деяких публікаціях [10183, 187] цей метод вказується як можливий для ідентифікації виду з точністю до 97-99% в залежності від роду.

За генотипом у нашому дослідженні ідентифіковані окремі види — *F.prausnitzii*, *L. johnsonii*, *L reuteri*. Вказані таксони населяють кишковий канал людини й тварин та проявляють протизапальну дію, продукують такі важливі метаболіти як КЛЖК (бутират). Окремі види родів *Neisseria*, *Coriobacterium*, *Aeromonas*, *Anaerobiospirillum* можуть проявляти себе як умовно патогенні. Властивостями пробіотиків характеризуються види *F. prausnitzii*, *L. johnsonii*, *L. Reuteri*.

При індукованою запаленні зменшувалась кількість бактерій порядку *Coriobacteriales* у порівнянні з контролем, але у тварин, що одержували сполуку Les-6490, кількість цих бактерій, а також *Aeromonadales* зростала, можливо, за рахунок таксонів з протизапальними властивостями.

При міжгруповому аналізі таксонів на рівні родин відмічено наростання кількості *Neisseriaceae*, проте у тварин, що одержували сполуку Les-6490, цей ефект достовірно знижувався. Оскільки окремі види *Neisseriaceae* здатні викликати запалення, то є підстави вважати, що у даному випадку проявились протизапальні властивості досліджуваної сполуки. Одночасно у тварин групи AL виявлено зростання рівня таксонів *Succinivibrionaceae*, до яких входять види з протизапальною дією та продуценти сукцинату – енергетичної сполуки для колоноцитів. Виявлено достовірне зростання бактерій родів *F.prausnitzii*, родів *Blautia*, *Lachnospiraceae* та *Anaerobiospirillum*.

F. prausnitzii є протизапальними коменсалами, що використовуються як пробіотичні штами для лікування хвороби Крона та інших запальних захворювань [225, 273] та як пробіотик/симбіотик в імунотерапії раку [60]. Також спостерігалось статистично достовірне збільшення кількості бактерій роду *Blautia* в групі AL порівняно з групою А. Бактерії цього роду можуть продукувати бутират, який має протизапальну дію і використовується для лікування запальних захворювань кишечника [3, 66, 276].

У групі AL чисельність роду *Lachnospiraceae* достовірно зросла порівняно з контрольною групою та групою А, що свідчить про сприяння проліферації *Lachnospiraceae* досліджуваною сполукою. *Lachnospiraceae*, бактерія, що

продукує бутират, корисна для кишкового бар'єру, брала участь у формуванні вісцеральної гіперчутливості [271].

Проте не виявлено зростання кількості таксонів роду *Collinsella*, групи NK3A20 родини *Lachnospiraceae* при індукованому запаленні у порівнянні з контролем (група А у порівнянні з групою AL).

Таким чином, міжгруповий t-тестовий аналіз таксонів різних рівнів показав різноспрямовану альтерацію мікробіомів кишкового каналу: зростання кількості таксонів, окремі види яких мають прозапальну дію; пригнічення показників прозапальних таксонів під дією сполуки Les-6490 та збільшення показників деяких видів пробіотичних бактерій при дії сполуки Les-6490.

Такий висновок підтверджено результатами метааналізу різниці між групами, при якому виявлено значущу або дуже значущу різницю відносного вмісту бактерій мікробіому роду *Collinsella* та родини *Lachnospiraceae* між групами K, AL та L, що підтверджує достовірний рівень впливу сполуки Les-6490 на склад мікробіоти кишкового каналу щурів.

Вплив мікробіоти кишкового каналу на фізіологічні та патофізіологічні процеси в організмі значною мірою розвивається при взаємодії з клітинами слизової. На цій основі ми здійснили вивчення мікробіому парієтальної мікрофлори на біомоделі щурів за загальною схемою, описаною в методиці досліджень.

У ході експерименту тварини одержували новосинтезовану сполуку похідну 4-тіазолідинону Les-6490 або препарат порівнянн – німесулід.

При виведенні тварини з експерименту для дослідження мікробіому відбиралась слизова тонкої кишки з пристінковим слизом. Методом секвенування 16S рРНК з наступною ампліфікацією з використанням відповідних праймерів генерувались OTU – операційні таксономічні одинці, аналіз яких дає змогу оцінити альтерацію парієтальної мікрофлори піддослідних тварин. Виявлено зменшення альфа-різноманітності в групі А, у якій індуковано запальний процес, ймовірно, внаслідок дії прозапальних цитокінів. Але при введенні сполуки Les-6490 стан альфа-різноманітності не відрізнявся від

контролю. Дендрограма різноманіття мікробіому парієтальної мікрофлори за складом вищих таксонів була близькою до показників мікробіому просвіту кишки – альфа-різноманітність в групі, що одержувала сполуку Les-6490, була вищою у порівнянні з групою контролю та групою, що одержувала німесулід.

При дослідженні домінантних таксонів в пристінкових мікробіомах досліджуваних груп тварин виявлено, що в контролі домінували роди *Lactobacillus*, *Stentotrophomonas*, *Nitrosomonas*, *Delftia*. При індукованому запаленні у тварин групи А і АL, бактерії роду *Lactobacillus* виявлялись у мінімальних кількостях, а у тварин, що одержували сполуку Les-6490, зменшувалась відносна кількість *Lactobacillus* та *Stentotrophomonas*, проте зростає кількість *Helicobacter*, чого не спостерігається у інших досліджуваних групах.

У групі L не виявляли бактерії роду *Delftia*, тоді як в інших групах вони виявлялись в однакових кількостях. У тварин груп А, АL та N ці бактерії виявляли у приблизно однакових кількостях. Такі результати свідчать про складні зв'язки між просвітною та пристінковою мікрофлорою в умовах індукованого запалення і дії протизапальних препаратів, що потребує додаткового вивчення. Однак чітко простежується вплив сполуки Les-6490 на альтерацію кишкового мікробіому, який виявився значнішим, ніж дія німесуліду.

Потреба в дослідженні видових таксонів випливає з того, що важливі властивості мікробіоти проявляються саме на рівні окремих видів чи варіантів одного виду. У щурів, корі одержували сполуку Les-6490, виявлено види *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Helicobacter*, які в інших групах відсутні, або виявляли в дещо менших кількостях. Проте у цій групі відмічено зниження кількості біфідобактерій, окремі види яких мають пробіотичні властивості. За цим показником парієтальна мікрофлора відрізняється від просвітної, котра характеризується як більш відкрита система. Часткове зниження біфідобактерій виявлено також у групах, що одержували німесулід. Тому питання про вплив НПЗП засобів на пробіотичну мікрофлору потребує спеціального вивчення.

Отже, при дослідженні просвітної та парієтальної мікрофлори щурів виявлено альтерацію мікробіомів кишкового каналу, яка особливо значна при дії новосинтезованої сполуки Les-6490.

ВИСНОВКИ

1. Синтезований похідний 4-тіазолідинону (5Z)-5-[(1,3-Дифенілпіразол-4-іл)метилен]тіазолідин-2,4-діон— сполука Les-6490, за умовами гострого експерименту віднесений до 4-класу токсичності (ЛД₅₀ сполуки для мишей, становить $910,0 \pm 57,0$ мг/кг) придатний для експериментального вивчення на тваринах.

2. Сполука Les-6490 проявила протизапальні властивості в експерименті на щурах із запаленням, індукованим ад'ювантом Фрейнда за клінічними та біометричними характеристиками запального процесу стопи, також за зниженням нейтрофільного лейкоцитозу на 34,8% ($p < 0,01$), переважаючи протизапальний ефект контрольного препарату німесулід — селективного інгібітора циклооксигенази. На фоні індукованого запального процесу сполука Les-6490 (група AL) впливала в бік підвищення кількісних рівнів представників грампозитивної мікробіоти порівняно з групою А таксонів з протизапальною дією: *Coriobacteriales*, *F. Prausnitzii*, *Blautia*, *Collinsella*; при цьому відносний вміст прозапальних таксонів *Neisseria* знижувався ($p < 0,05$).

3. Досліджувана сполука та препарат порівняння німесулід, істотно не відрізнялись за впливом на біохімічні показники крові — загальний протеїн, альбуміни, креатинін. Відмічено зниження рівня трансаміназ у тварин, що перебували в досліді у порівнянні з контролем, що вказує на відсутність гепатотоксичної дії в умовах експерименту.

4. Сполука Les-6490, відібрана на основі скринінгу 22 похідних 4-тіазолідинону, проявила помірну та вибірккову антимікробну дію на стандартні та клінічні штами *S. aureus*, не впливаючи на кількісний рівень лактобактерій і протеобактерій. Протигрибкова дія проявлялась на рівні МІК контрольного препарату — клотримазолу, а саме до *Saccharomyces cerevisiae* N62 і становила 820 $\mu\text{M}/\text{л}$.

5. За результати метагеномного аналізу із застосуваннями статистичних методів — визначення кривої біорізноманіття, індексів ACE, графіків «цілого дерева» — встановивлено зростання альфа-різноманіття більшою мірою за дії

сполуки Les- 6490, ніж при застосуванні препарату порівняння німесулідю та наростання бета-різноманіття мікробіому у дослідних групах тварин.

6. Методом секвенування 16s рРНК і аналізі операційних таксономічних одиниць мікроорганізмів серед тварин, котрі одержували сполуку Les-6490 виявлено високий вміст бактерій роду *Helicobacter*, окремі види яких продукують антибактеріальні білки, ефективні відносно патогенного виду. Крім того, похідний 4-тіазолідинону Les-6490 має потенціал антитрепонемної активності за результатами досліджень *in vivo*. Застосування t-тестового аналізу таксонів різних рівнів, а також методів метагеноміки дало змогу виявити значну різницю вмісту бактерій родів *Collinsella* та родини *Lachnospiraceae* у біомах тварин, що одержували сполуку Les- 6490 ($p < 0,01$).

7. При дослідженнях складу парієтального мікробіому щурів, що одержували сполуку Les-6490, виявлено високі операційні одиниці, які відповідали геномам видів *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Helicobacter*, котрі в тварин інших груп відсутні, на тлі дефіциту біфідобактерій у просвітних мікробіомах, що вказує на потребу подальшого вивчення співвідношень між просвітною та парієтальною мікробіотою при дії нестероїдних протизапальних засобів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Abdou, M. M., El-Saeed, R. A., & Bondock, S. (2019). Recent advances in 4-hydroxycoumarin chemistry. Part 1: Synthesis and reactions. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(1), 88–121. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.012>
2. Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, 11(5), 627–635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
3. Aguilera-Correa, J.-J.; Madrazo-Clemente, P.; Martínez-Cuesta, M.d.C.; Peláez, C.; Ortiz, A.; Sánchez-Niño, M.D.; Esteban, J.; Requena, T. Lyso-Gb3 Modulates the Gut Microbiota and Decreases Butyrate Production. *Sci. Rep.* 2019, 9, 12010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48426-4>
4. Ahmadi, M., Bekeschus, S., Weltmann, K. D., von Woedtke, T., & Wende, K. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC medicinal chemistry*, 13(5), 471–496. <https://doi.org/10.1039/d1md00280e>
5. Ahmadi, M.; Bekeschus, S.; Weltmann, K.-D.; von Woedtke, T.; Wende, K. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Recent Advances in the Use of Synthetic COX-2 Inhibitors. *RSC Med. Chem.* 2022, 13, 471–496, doi:10.1039/D1MD00280E.
6. Ahmed S, Gul S, Zia-ul-Haq M, Riaz M. Hypolipidemic effects of nimesulide and celecoxib in experimentally induced hypercholesterolemia in rabbits. *Turk J Med Sci.* 2015;45(2):277-83. Doi: 10.3906/sag-1312-106. PMID: 26084115
7. Akhtar, M., Chen, Y., Ma, Z., Zhang, X., Shi, D., Khan, J. A., & Liu, H. (2021). Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)*, 8, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.11.005>

8. Akhtar, M., Chen, Y., Ma, Z., Zhang, X., Shi, D., Khan, J. A., & Liu, H. (2022). Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Animal Nutrition*, 8, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.11.005>
9. Al Bander, Z., Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International journal of environmental research and public health*, 17(20), 7618. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>
10. Aldriwesh, M. G., Al-Mutairi, A. M., Alharbi, A. S., Aljohani, H. Y., Alzahrani, N. A., Ajina, R., & Alanazi, A. M. (2023). Paediatric Asthma and the Microbiome: A Systematic Review. *Microorganisms*, 11(4), 939. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040939>
11. Alkan, G. ., Ulusoy, S., Akgün, M., & Oral, A. . (2023). Antibacterial and antibiofilm activities of sodium ibuprofen- and paracetamol-loaded nanofibers . *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 42(1), 47–56. <https://doi.org/10.20450/mjcce.2023.2584>
12. Anachad O, Taouil A, Taha W, Bennis F, Chegdani F. The Implication of Short-Chain Fatty Acids in Obesity and Diabetes. *Microbiology Insights*. 2023;16. doi:10.1177/11786361231162720
13. Antidiabetic Agents. (2017). In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
14. Antimicrobial activities of peptide Cbf-K₁₆ against drug-resistant *Helicobacter pylori* infection in vitro and in vivo. *Microbial pathogenesis*, 138, 103847. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103847>
15. Ather AQ, Tahir MN, Khan MA, Mehmood K, Chaudhry F. 1,3-Diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online*. 2010;66(Pt 12):o3170. doi: 10.1107/S1600536810045630.
16. Ayling, R. M., & Kok, K. (2018). Fecal Calprotectin. *Advances in clinical chemistry*, 87, 161–190. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.005>

17. Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., & Coppolino, M. F. (2012). Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*, 11(1), 52–64. <https://doi.org/10.2174/187152312803476255>
18. Bajinka, O., Darboe, A., Tan, Y., Abdelhalim, K. A., & Cham, L. B. (2020). Gut microbiota and the human gut physiological changes. *Annals of Microbiology*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01608-2>
19. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016. Vol. 6, no. 2. P. 71–79. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005> (date of access: 07.05.2024).
20. Baquero, F., & Nombela, C. (2012). The microbiome as a human organ. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 4, 2–4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>
21. Barbosa, K. P., Santos, L. A., Ribeiro, E. L., Fragoso, I. T., Rocha, S. W., Nunes, A. K., França, M. E., Silva, B. S., Silva, A. K., Donato, M. A., Gomes, F. O., Silva, T. G., Pitta, I. R., Pitta, M. R., Lima, M. C., Uchôa, F. D., Galdino, S. L., & Peixoto, C. A. (2013). Reduction of carrageenan-induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. *European journal of pharmacology*, 718(1-3), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.033>
22. Barkin R. L. (2015). Topical Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: The Importance of Drug, Delivery, and Therapeutic Outcome. *American journal of therapeutics*, 22(5), 388–407. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3182459abd>
23. Bedford, A., & Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)*, 4(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.010>

24. Belkacemi, S.; Tidjani Alou, M.; Million, M.; Levasseur, A.; Khelaifia, S.; Raoult, D. Prevalence of Treponema Species in the Gut Microbiome Is Linked to Bifidobacterium Sp. and Bacteroides Sp. Res. Sq. 2020, 1–28. doi.org/10.21203/rs.3.rs-117420/v1
25. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
26. Bessone F, Hernandez N, Mendizabal M, Ridruejo E, Gualano G, Fassio E, Peralta M, Fainboim H, Anders M, Tanno H, Tanno F, Parana R, Medina-Caliz I, Robles-Diaz M, Alvarez-Alvarez I, Niu H, Stephens C, Colombato L, Arrese M, Reggiardo MV, Ono SK, Carrilho F, Lucena MI, Andrade RJ. Serious liver injury induced by Nimesulide: an international collaborative study. Arch Toxicol. 2021 Apr;95(4):1475-1487. Doi: 10.1007/s00204-021-03000-8. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33759010.
27. Beukema, M., Faas, M. M., & de Vos, P. (2020). The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells. *Experimental & molecular medicine*, 52(9), 1364–1376. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0449-2>
28. Bhati, S. K., & Kumar, A. (2008). Synthesis of new substituted azetidinoyl and thiazolidinoyl-1,3,4-thiadiazino (6,5-b) indoles as promising anti-inflammatory agents. *European journal of medicinal chemistry*, 43(11), 2323–2330. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.10.012>
29. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, 180, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>

30. Bindu, S.; Mazumder, S.; Bandyopadhyay, U. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Organ Damage: A Current Perspective. *Biochem. Pharmacol.* 2020, 180, 114147, doi:10.1016/j.bcp.2020.114147.
31. Bonde, C. G., & Gaikwad, N. J. (2004). Synthesis and preliminary evaluation of some pyrazine containing thiazolines and thiazolidinones as antimicrobial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(9), 2151–2161. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.02.024>
32. Botros, M., & Sikaris, K. A. (2013). The de Ritis ratio: the test of time. *The Clinical biochemist. Reviews*, 34(3), 117–130.].
33. Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet* 383, 1490–1502. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9
34. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, December 7). NSAID. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/NSAID>
35. Brooke J. S. (2021). Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), e0003019. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-19>,
36. Burek, D. J., Massaly, N., Yoon, H. J., Doering, M., & Morón, J. A. (2022). Behavioral outcomes of complete Freund adjuvant-induced inflammatory pain in the rodent hind paw: a systematic review and meta-analysis. *Pain*, 163(5), 809–819. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002467>
37. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nat. Methods* 2010, 7, 335–336, doi:10.1038/nmeth.f.303.
38. Cenit, M. C., Sanz, Y., & Codoñer-Franch, P. (2017). Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World journal of gastroenterology*, 23(30), 5486–5498. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i30.5486>
39. Chang, Y., Hawkins, B. A., Du, J. J., Groundwater, P. W., Hibbs, D. E., & Lai, F. (2023). A guide to in silico drug design. *Pharmaceutics*, 15(1), 49.

40. Chen, C. Y., Kao, C. L., & Liu, C. M. (2018). The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2729. <https://doi.org/10.3390/ijms19092729>
41. Chen, R. Y., Mostafa, I., Hibberd, M. C., Das, S., Mahfuz, M., Naila, N. N., Islam, M. M., Huq, S., Alam, M. A., Zaman, M. U., Raman, A. S., Webber, D., Zhou, C., Sundaresan, V., Ahsan, K., Meier, M. F., Barratt, M. J., Ahmed, T., & Gordon, J. I. (2021). A Microbiota-Directed Food Intervention for Undernourished Children. *The New England journal of medicine*, 384(16), 1517–1528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2023294>
42. Chiu, C. Y., Cheng, M. L., Chiang, M. H., Kuo, Y. L., Tsai, M. H., Chiu, C. C., & Lin, G. (2019). Gut microbial-derived butyrate is inversely associated with IgE responses to allergens in childhood asthma. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 30(7), 689–697. <https://doi.org/10.1111/pai.13096>
43. Chow, J., Tang, H., & Mazmanian, S. K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current opinion in immunology*, 23(4), 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.010>
44. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
45. Clavel, T., Lepage, P., Charrier, C. (2014). The Family *Coriobacteriaceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_343

46. Clemente, J. C., Pehrsson, E. C., Blaser, M. J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., Magris, M., Hidalgo, G., Contreras, M., Noya-Alarcón, Ó., Lander, O., McDonald, J., Cox, M., Walter, J., Oh, P. L., Ruiz, J. F., Rodriguez, S., Shen, N., Song, S. J., Metcalf, J., ... Dominguez-Bello, M. G. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science advances*, *1*(3), e1500183. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>
47. Comparative analysis of the intestinal microbiome in *Rattus norvegicus* from different geographies / T. Shah et al. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1283453> (date of access: 01.03.2024).
48. d'Angelo, M., Brandolini, L., Catanesi, M., Castelli, V., Giorgio, C., Alfonsetti, M., Tomassetti, M., Zippoli, M., Benedetti, E., Cesta, M. C., Colagioia, S., Cocchiario, P., Cimini, A., & Allegretti, M. (2023). Differential Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in an In Vitro Model of Human Leaky Gut. *Cells*, *12*(5), 728. <https://doi.org/10.3390/cells12050728>
49. Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of clinical laboratory analysis*, *36*(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
50. Davis, J. S., Lee, H. Y., Kim, J., Advani, S. M., Peng, H. L., Banfield, E., Hawk, E. T., Chang, S., & Frazier-Wood, A. C. (2017). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in US adults: changes over time and by demographic. *Open heart*, *4*(1), e000550. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2016-000550>
51. De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 107(33), 14691–14696.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
52. de Matos, R. F., Mendonça, L. C. V., da Silva Souza, K. G., Fonseca, A. A. D., Costa, E. M. S., de Lima, M. V. D., Vieira, J. M. D. S., de Brito, M. T. F. M., & Monteiro, M. C. (2017). Nimesulide inhibits pathogenic fungi: PGE2-dependent mechanisms. *Folia microbiologica*, 62(2), 169–174.
<https://doi.org/10.1007/s12223-016-0483-6>
53. Depner, M., Ege, M. J., Cox, M. J., Dwyer, S., Walker, A. W., Birzele, L. T., Genuneit, J., Horak, E., Braun-Fahrländer, C., Danielewicz, H., Maier, R. M., Moffatt, M. F., Cookson, W. O., Heederik, D., von Mutius, E., & Legatzki, A. (2017). Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 139(3), 826–834.e13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.050>
54. Desai, N. C., Jadeja, D. J., Khasiya, A. G., Dave, B. P., & Khedkar, V. M. (2023). 4-Thiazolidinone Based 5-Arylidene Hybrids: Design, Synthesis, Antimicrobial Activity, and Molecular Docking Studies. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10406638.2023.2220867>
55. Dicks, L. M. T., Dreyer, L., Smith, C., & van Staden, A. D. (2018). A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut-Blood Barrier?. *Frontiers in microbiology*, 9, 2297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02297>
56. Du, Y., Liu, Y., Hu, J., Peng, X., & Liu, Z. (2023). CRISPR/Cas9 systems: Delivery technologies and biomedical applications. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 18(6), 100854. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2023.100854>
57. Dwiyanto, J., Ayub, Q., Lee, S. M., Foo, S. C., Chong, C. W., & Rahman, S. (2021). Geographical separation and ethnic origin influence the human gut microbial composition: a meta-analysis from a Malaysian perspective. *Microbial genomics*, 7(8), 000619. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000619>

58. Edgar, R.C. UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads. *Nat. Methods* 2013, 10, 996–998, doi:10.1038/nmeth.2604.
59. Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection. *Bioinformatics* 2011, 27, 2194–2200, doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
60. Effendi, R.M.R.A.; Anshory, M.; Kalim, H.; Dwiyana, R.F.; Suwarsa, O.; Pardo, L.M.; Nijsten, T.E.C.; Thio, H.B. Akkermansia Muciniphila and Faecalibacterium Prausnitzii in Immune-Related Diseases. *Microorganisms* 2022, 10, 2382. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122382>.
61. Efremova, I., Maslennikov, R., Poluektova, E., Vasilieva, E., Zharikov, Y., Suslov, A., Letyagina, Y., Kozlov, E., Levshina, A., & Ivashkin, V. (2023). Epidemiology of small intestinal bacterial overgrowth. *World journal of gastroenterology*, 29(22), 3400–3421. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i22.3400>
62. Eggleton JS, Jialal I. Thiazolidinediones. [Updated 2023 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551656/>
63. Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters*, 38(6), 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>
64. Erhan, Ertugrul & Salcan, Ismail & Dilber, Muhammet & Akyuz, Sumeyye & Dabanlioglu, Bulent & Suleyman, Bahadir & Coban, Taha & Suleyman, Halis & Mammadov, Renad. (2021). Protective effect of nimesulide on the external ear damage induced by staphylococcus aureus inoculation in rats. *Medicine Science | International Medical Journal*. 10. 577. 10.5455/medscience.2021.02.050.
65. EUCAST. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method Version 8.0 January. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Diseases*.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf

66. Facchin, S.; Vitulo, N.; Calgaro, M.; Buda, A.; Romualdi, C.; Pohl, D.; Perini, B.; Lorenzon, G.; Marinelli, C.; D'Inca, R.; et al. Microbiota Changes Induced by Microencapsulated Sodium Butyrate in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 2020, 32, e13914. <https://doi.org/10.1111/nmo.13914>

67. Faki Y, Er A. Different Chemical Structures and Physiological/Pathological Roles of Cyclooxygenases. *Rambam Maimonides Med J.* 2021 Jan 19;12(1):e0003. doi: 10.5041/RMMJ.10426. PMID: 33245277; PMCID: PMC7835113.

68. Faki, Y., & Er, A. (2021). Different Chemical Structures and Physiological/Pathological Roles of Cyclooxygenases. *Rambam Maimonides medical journal*, 12(1), e0003. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10426>

69. Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature reviews. Microbiology*, 19(1), 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>

70. Fedir Hladkykh & NULL AUTHOR_ID. (2022). Nesteroidni protyzapalni zasoby: shliakhy optymizatsii terapevtychnykh ta pobichnykh efektiv . <https://doi.org/10.46879/2022.1>

71. Fiorani, Marcello, Ege Tohumcu, Livio Enrico Del Vecchio, Serena Porcari, Giovanni Cammarota, Antonio Gasbarrini, and Gianluca Ianiro. 2023. "The Influence of *Helicobacter pylori* on Human Gastric and Gut Microbiota" *Antibiotics* 12, no. 4: 765. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040765>

72. Fontes, J. A., Barin, J. G., Talor, M. V., Stickel, N., Schaub, J., Rose, N. R., & Čiháková, D. (2017). Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during

initiation of the immune response. *Immunity, inflammation and disease*, 5(2), 163–176. <https://doi.org/10.1002/iid3.155>

73. Fukuyama, J., McMurdie, P. J., Dethlefsen, L., Relman, D. A., & Holmes, S. (2012). Comparisons of distance methods for combining covariates and abundances in microbiome studies. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 213–224

74. Gao, X.; Zhang, H.; Li, K.; Shi, Y.; Guo, X.; Wang, L.; Li, D. Sandalwood Seed Oil Improves Insulin Sensitivity in High-Fat/High-Sucrose Diet-Fed Rats Associated with Altered Intestinal Microbiota and Its Metabolites. *Food Funct.* **2021**, *12*, 9739–9749. <https://doi.org/10.1039/D1FO02239C>

75. Garavito, R. M., & Mulichak, A. M. (2003). The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 32, 183–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141906>

76. Garrett W. S. (2019). The gut microbiota and colon cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6446), 1133–1135. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2367>

77. Gasaly, N., de Vos, P., & Hermoso, M. A. (2021). Impact of Bacterial Metabolites on Gut Barrier Function and Host Immunity: A Focus on Bacterial Metabolism and Its Relevance for Intestinal Inflammation. *Frontiers in immunology*, 12, 658354. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.658354>

78. Gehrig, J. L., Venkatesh, S., Chang, H. W., Hibberd, M. C., Kung, V. L., Cheng, J., Chen, R. Y., Subramanian, S., Cowardin, C. A., Meier, M. F., O'Donnell, D., Talcott, M., Spears, L. D., Semenkovich, C. F., Henrissat, B., Giannone, R. J., Hettich, R. L., Ilkayeva, O., Muehlbauer, M., Newgard, C. B., ... Gordon, J. I. (2019). Effects of microbiota-directed foods in gnotobiotic animals and undernourished children. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6449), eaau4732. <https://doi.org/10.1126/science.aau4732>

79. Ghoshal, U. C., & Ghoshal, U. (2017). Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Other Intestinal Disorders. *Gastroenterology clinics of North America*, 46(1), 103–120. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.008>
80. Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Wilkinson, S. A., Callaway, L. K., McIntyre, H. D., Morrison, M., & Dekker Nitert, M. (2018). Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut microbes*, 9(3), 189–201. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1406584>,
81. Gong, D.; Gong, X.; Wang, L.; Yu, X.; Dong, Q. Involvement of Reduced Microbial Diversity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016, 2016, 6951091. H,
82. Gor, D., Gerber, B. S., Walton, S. M., Lee, T. A., Nutescu, E. A., & Touchette, D. R. (2020). Antidiabetic drug use trends in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: A cross-sectional analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of diabetes*, 12(5), 385–395. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.13003>
83. Gorkiewicz, G.; Feierl, G.; Schober, C.; Dieber, F.; Köfer, J.; Zechner, R.; Zechner, E.L. Species-Specific Identification of *Campylobacters* by Partial 16S rRNA Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 2537–2546. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2537-2546.2003>.
84. Grosser, T., Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2017). The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Trends in pharmacological sciences*, 38(8), 733–748. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.05.008>
85. Guzman, J. D., Evangelopoulos, D., Gupta, A., Birchall, K., Mwaigwisya, S., Saxty, B., McHugh, T. D., Gibbons, S., Malkinson, J., & Bhakta, S. (2013). Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic assay. *BMJ open*, 3(6), e002672. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002672>

86. Hadrich D. (2018). Microbiome Research Is Becoming the Key to Better Understanding Health and Nutrition. *Frontiers in genetics*, 9, 212. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00212>
87. Harman, T. (2017). *Your baby's microbiome: The critical role of vaginal birth and breastfeeding for lifelong health*.
88. Hata, A. N., & Breyer, R. M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics*, 103(2), 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.06.003>
89. Ho, K. Y., Gwee, K. A., Cheng, Y. K., Yoon, K. H., Hee, H. T., & Omar, A. R. (2018). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic pain: implications of new data for clinical practice. *Journal of pain research*, 11, 1937–1948. <https://doi.org/10.2147/JPR.S168188>
90. Højgaard, S. M. M., Rezahosseini, O., Knudsen, J. D., Fuglebjerg, N. J. U., Skov, M., Nielsen, S. D., & Harboe, Z. B. (2022). Characteristics and Outcomes of Patients with *Delftia acidovorans* Infections: a Retrospective Cohort Study. *Microbiology spectrum*, 10(4), e0032622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00326-22>
91. Horta-Baas, G.; Romero-Figueroa, M.D.S.; Montiel-Jarquín, A.J.; Pizano-Zárate, M.L.; García-Mena, J.; Ramírez-Durán, N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol. Res.* **2017**, 2017, 4835189.
92. Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z. S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
93. Hu, Y., Ye, Z., Wu, M., She, Y., Li, L., Xu, Y., Qin, K., Hu, Z., Yang, M., Lu, F., & Ye, Q. (2022). Corrigendum: The Communication Between Intestinal Microbiota and Ulcerative Colitis: An Exploration of Pathogenesis,

Animal Models, and Potential Therapeutic Strategies. *Frontiers in medicine*, 9, 886105. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.886105>

94. Hui, Y., Vestergaard, G., Deng, L., Kot, W. P., Thymann, T., Brunse, A., & Nielsen, D. S. (2022). Donor-dependent fecal microbiota transplantation efficacy against necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *NPJ biofilms and microbiomes*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00310-2>

95. Hunt, R. H., & Bazzoli, F. (2004). Review article: should NSAID/low-dose aspirin takers be tested routinely for *H. pylori* infection and treated if positive? Implications for primary risk of ulcer and ulcer relapse after initial healing. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 19 Suppl 1, 9–16. <https://doi.org/10.1111/j.0953-0673.2004.01830.x>

96. Ismail, C. A. N., Mohd Noh, A. S., Tan, D. C., Mohamed Khir, N. A., & Shafin, N. (2022). A Review on Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritic Rat Model: Factors Leading to its Success. *IIUM Medical Journal Malaysia*, 21(4). <https://doi.org/10.31436/imjm.v21i4.2026>

97. Iwatani S., Graham D. Y. Helicobacter Species: Methods and Protocols. *Gastroenterology*. 2013. Vol. 145, no. 2. P. 485. URL: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.015> (date of access: 06.04.2024).

98. Iwatani, S., & Graham, D. Y. (2013). Helicobacter Species: Methods and Protocols. *Gastroenterology*, 145(2), 485. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.015>

99. J.O.B.F.J.R.A. Chicoine, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in: J.F.K.J.D.M.J. Wang (Ed.), Chemical Analysis of Non-antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food, Wiley Online Library 2016, pp. 427-496.

100. Jain, A. K., Vaidya, A., Ravichandran, V., Kashaw, S. K., & Agrawal, R. K. (2012). Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(11), 3378–3395. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.069>

101. Janda, J.M.; Abbott, S.L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.
102. Jeong Y, Jhun J, Lee SY, Na HS, Choi J, Cho KH, et al.. Therapeutic potential of a novel bifidobacterium identified through microbiome profiling of RA patients with different RF levels. *Front Immunol* (2021) 12:736196. doi: 10.3389/fimmu.2021.736196,
103. Jha, A. R., Davenport, E. R., Gautam, Y., Bhandari, D., Tandukar, S., Ng, K. M., Fragiadakis, G. K., Holmes, S., Gautam, G. P., Leach, J., Sherchand, J. B., Bustamante, C. D., & Sonnenburg, J. L. (2018). Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS biology*, 16(11), e2005396. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005396>
104. Jian, H., Liu, Y., Wang, X., Dong, X., & Zou, X. (2023). Akkermansia muciniphila as a Next-Generation Probiotic in Modulating Human Metabolic Homeostasis and Disease Progression: A Role Mediated by Gut–Liver–Brain Axes? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3900. <https://doi.org/10.3390/ijms24043900>
105. Jin, Z., Ng, A., Maurice, C. F., & Juncker, D. (2022). The Mini Colon Model: a benchtop multi-bioreactor system to investigate the gut microbiome. *Gut microbes*, 14(1), 2096993. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2096993>
106. Johnson, A. J., Vangay, P., Al-Ghalith, G. A., Hillmann, B. M., Ward, T. L., Shields-Cutler, R. R., Kim, A. D., Shmagel, A. K., Syed, A. N., Personalized Microbiome Class Students, Walter, J., Menon, R., Koecher, K., & Knights, D. (2019). Daily Sampling Reveals Personalized Diet-Microbiome Associations in Humans. *Cell host & microbe*, 25(6), 789–802.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.005>
107. Jordyn T Wallenborn, Pascale Vonaesch, Intestinal microbiota research from a global perspective, *Gastroenterology Report*, Volume 10, 2022, goac010, <https://doi.org/10.1093/gastro/goac010>

108. Judkins, T. C., Solch-Ottaiano, R. J., Ceretto-Clark, B., Nieves, C., Jr, Colee, J., Wang, Y., Tompkins, T. A., Caballero-Calero, S. E., & Langkamp-Henken, B. (2024). The effect of an acute aspirin challenge on intestinal permeability in healthy adults with and without prophylactic probiotic consumption: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *BMC gastroenterology*, 24(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12876-023-03102-w>
109. Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology*, 13(5), 321–335. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
110. Kaminsky, R. A., Reid, P. M., Altermann, E., Kenters, N., Kelly, W. J., Noel, S. J., Attwood, G. T., & Janssen, P. H. (2023). Ruminal *Lachnospiraceae* isolate NK3A20 exhibits metabolic flexibility in response to substrate and coculture with a methanogen. *Applied and environmental microbiology*, 89(10), e0063423.
111. Kaminsky, D., Bednarczyk-Cwynar, B., Vasylenko, O. *et al.* Synthesis of new potential anticancer agents based on 4-thiazolidinone and oleanane scaffolds. *Med Chem Res* 21, 3568–3580 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9893-9>
112. Kaminsky, D., Kryshchyshyn, A., & Lesyk, R. (2017). Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 12(12), 1233–1252. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1388370>
113. Karcher, N., Pasolli, E., Asnicar, F., Huang, K. D., Tett, A., Manara, S., Armanini, F., Bain, D., Duncan, S. H., Louis, P., Zolfo, M., Manghi, P., Valles-Colomer, M., Raffaetà, R., Rota-Stabelli, O., Collado, M. C., Zeller, G., Falush, D., Maixner, F., Walker, A. W., ... Segata, N. (2020). Analysis of 1321 *Eubacterium rectale* genomes from metagenomes uncovers complex phylogeographic population structure and subspecies functional adaptations. *Genome biology*, 21(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02042-y>

114. Karumanchi, S. K., Atmakuri, L. R., Mandava, V. B. R., & Rajala, S. (2019). Synthesis and Hypoglycemic and Anti-inflammatory Activity Screening of Novel Substituted 5-[Morpholino(Phenyl)Methyl]-Thiazolidine-2,4-Diones and Their Molecular Docking Studies. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 16(4), 380–391. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.82612>
115. Kastl, A. J., Jr, Terry, N. A., Wu, G. D., & Albenberg, L. G. (2020). The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 9(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>
116. Khine, W. W. T., Haldar, S., De Loi, S., & Lee, Y. K. (2021). A single serving of mixed spices alters gut microflora composition: a dose-response randomised trial. *Scientific reports*, 11(1), 11264. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90453-7>
117. Khine, W. W. T., Zhang, Y., Goie, G. J. Y., Wong, M. S., Liong, M., Lee, Y. Y., Cao, H., & Lee, Y. K. (2019). Gut microbiome of pre-adolescent children of two ethnicities residing in three distant cities. *Scientific reports*, 9(1), 7831. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44369-y>
118. Kirjavainen, P. V., Karvonen, A. M., Adams, R. I., Täubel, M., Roponen, M., Tuoresmäki, P., Loss, G., Jayaprakash, B., Depner, M., Ege, M. J., Renz, H., Pfefferle, P. I., Schaub, B., Lauener, R., Hyvärinen, A., Knight, R., Heederik, D. J. J., von Mutius, E., & Pekkanen, J. (2019). Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma development. *Nature medicine*, 25(7), 1089–1095. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0469-4>
119. Kobilinska, L. I. (2021). Biochemical mechanisms of the antitumor effect of 4-thiazolidinone derivatives when they are delivered to cells by a nanosized polymer carrier [Dissertation, Danylo Halytskyi National Medical University]. https://www.biochemistry.org.ua/images/autoref_pdf/kobylynska/diskli.pdf repository

120. Konechnyi Y, Rumynska T, Yushyn I, Holota S, Turkina V, Ryviuk Rydel M, Sękowska A, Salyha Y, Korniychuk O, Lesyk R. A New 4-Thiazolidinone Derivative (Les-6490) as a Gut Microbiota Modulator: Antimicrobial and Prebiotic Perspectives. *Antibiotics*. 2024; 13(4):291. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040291>
121. Konechnyi, Y.; Lozynskyi, A.; Ivasechko, I.; Dumych, T.; Paryzhak, S.; Hrushka, O.; Partyka, U.; Pasichnyuk, I.; Khylyuk, D.; Lesyk, R. 3-[5-(1*H*-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]-propionic Acid as a Potential Polypharmacological Agent. *Sci. Pharm.* **2023**, *91*, 13. <https://doi.org/10.3390/scipharm91010013>
122. Konechnyi, Y.T.; Lozynskyi, A.V.; Horishny, V.Y.; Konechna, R.T.; Vynnytska, R.B.; Korniychuk, O.P.; Lesyk, R.B. Synthesis of Indoline-Thiazolidinone Hybrids with Antibacterial and Antifungal Activities. *Biopolym. Cell* **2020**, *36*, 381–391.
123. Konechnyi, Y. T., Lozynskyi, A. V., Horishny, V. Y., Konechna, R. T., Vynnytska, R. B., Korniychuk, O. P., & Lesyk, R. B. (2020). Synthesis of indoline-thiazolidinone hybrids with antibacterial and antifungal activities. *Biopolymers and Cell*, *36*(5), 381–391. <https://doi.org/10.7124/bc.000a3a>
124. Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kekkonen, R. A., & de Vos, W. M. (2016). Association of Early-Life Antibiotic Use and Protective Effects of Breastfeeding: Role of the Intestinal Microbiota. *JAMA pediatrics*, *170*(8), 750–757. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.0585>
125. Korpela, K., Zijlmans, M. A., Kuitunen, M., Kukkonen, K., Savilahti, E., Salonen, A., de Weerth, C., & de Vos, W. M. (2017). Childhood BMI in relation to microbiota in infancy and lifetime antibiotic use. *Microbiome*, *5*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0245-y>
126. Kowalski, M. L., & Makowska, J. S. (2015). Seven steps to the diagnosis of NSAIDs hypersensitivity: how to apply a new classification in real

practice?. *Allergy, asthma & immunology research*, 7(4), 312–320.
<https://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.4.312>

127. Kraemer, J. G., Aebi, S., Hilty, M., & Oppliger, A. (2021). Nasal microbiota composition dynamics after occupational change in animal farmers suggest major shifts. *The Science of the total environment*, 782, 146842.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146842>

128. Kraemer, J. G., Aebi, S., Oppliger, A., & Hilty, M. (2019). The Indoor-Air Microbiota of Pig Farms Drives the Composition of the Pig Farmers' Nasal Microbiota in a Season-Dependent and Farm-Specific Manner. *Applied and environmental microbiology*, 85(9), e03038-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03038-18>

129. Krautkramer, K. A., Fan, J., & Bäckhed, F. (2021). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature reviews. Microbiology*, 19(2), 77–94. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0438-4>

130. Kryshchyshyn-Dylevych, A. P., Zelisko, N. I., Grellier, P., & Lesyk, R. B. (2020). Preliminary evaluation of thiazolidinone- and pyrazoline-related heterocyclic derivatives as potential antimalarial agents. *Biopolymers and Cell*, 36(1), 47–59. <https://doi.org/10.7124/bc.000a20>

131. Kryshchyshyn-Dylevych, A. P., Zelisko, N. I., Grellier, P., & Lesyk, R. B. (2020b). Preliminary evaluation of thiazolidinone- and pyrazoline-related heterocyclic derivatives as potential antimalarial agents. *Biopolymers and Cell*, 36(1), 47–59. <https://doi.org/10.7124/bc.000a20>

132. Kumar, A., Rajput, C. S., & Bhati, S. K. (2007). Synthesis of 3-[4'-(p-chlorophenyl)-thiazol-2'-yl]-2-[(substituted azetidinone/thiazolidinone)-aminomethyl]-6-bromoquinazolin-4-ones as anti-inflammatory agent. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(8), 3089–3096.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.042>

133. Kumari, P., & B. Patel, A. (Eds.). (2023). Strategies for the Synthesis of Heterocycles and Their Applications. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.104135

134. Kursov, S., & Nikonov, V. (2022). Cyclooxygenase: Physiological Effects, Inhibitors Action and Perspectives of Paracetamol Usage. *EMERGENCY MEDICINE*, (5.76), 27–35. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.5.76.2016.76430>
135. Kyriachenko, Y., Falalyeyeva, T., Korotkyi, O., Molochek, N., & Kobyljak, N. (2019). Crosstalk between gut microbiota and antidiabetic drug action. *World journal of diabetes*, 10(3), 154–168. <https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i3.154>
136. Kwon, J., Bae, M., Szamosvári, D., Cassilly, C. D., Bolze, A. S., Jackson, D. R., Xavier, R. J., & Clardy, J. (2023). *Collinsella aerofaciens* Produces a pH-Responsive Lipid Immunogen. *Journal of the American Chemical Society*, 145(13), 7071–7074. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c00250>,
137. Lacerda, D.C.; Trindade da Costa, P.C.; Pontes, P.B.; Carneiro dos Santos, L.A.; Cruz Neto, J.P.R.; Silva Luis, C.C.; de Sousa Brito, V.P.; de Brito Alves, J.L. Potential Role of *Limosilactobacillus Fermentum* as a Probiotic with Anti-Diabetic Properties: A Review. *World J. Diabetes* 2022, 13, 717–728. H
138. Lavelle, A., & Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 17(4), 223–237. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0258-z>
139. Lázár, B., László, S. B., Hutka, B., Tóth, A. S., Mohammadzadeh, A., Berekméri, E., Ágg, B., Balogh, M., Sajtos, V., Király, K., Al-Khrasani, M., Földes, A., Varga, G., Makra, N., Ostorházi, E., Szabó, D., Ligeti, B., Kemény, Á., Helyes, Z., Ferdinandy, P., ... Zádori, Z. S. (2021). A comprehensive time course and correlation analysis of indomethacin-induced inflammation, bile acid alterations and dysbiosis in the rat small intestine. *Biochemical pharmacology*, 190, 114590. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114590>
140. Leão, C., Borges, A., & Simões, M. (2020). NSAIDs as a Drug Repurposing Strategy for Biofilm Control. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(9), 591. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090591>

141. Lee, J. Y., Tsois, R. M., & Bäuml, A. J. (2022). The microbiome and gut homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 377(6601), eabp9960. <https://doi.org/10.1126/science.abp9960>

142. Liesen, A., de Aquino, T.M., Carvalho, C.S., Lima, V., de Araújo, J.M., de Lima, J.G., de Faria, A.R., de Melo, E.J., Alves, A.J., Alves, E.W., Alves, A.Q., & Góes, A.J. (2010). Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 45 9, 3685-91 .

143. Lima, A. A. M., Soares, A. M., Filho, J. Q. S., Havt, A., Lima, I. F. N., Lima, N. L., Abreu, C. B., Junior, F. S., Mota, R. M. S., Pan, W. K., Troeger, C., Medeiros, P. H. Q. S., Veras, H. N., Prata, M. A., McCormick, B. J. J., McGrath, M., Rogawski, E. T., Houpt, E. R., Platts-Mills, J. A., Gratz, J., ... Guerrant, R. L. (2018). Enteroaggregative Escherichia coli Subclinical Infection and Coinfections and Impaired Child Growth in the MAL-ED Cohort Study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 66(2), 325–333. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001717>

144. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1949**, 96, 99–113.

145. Liu, X., Mao, B., Gu, J., Wu, J., Cui, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2021). *Blautia*-a new functional genus with potential probiotic properties?. *Gut microbes*, 13(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>,

146. Liu, Y., & Dai, M. (2020b). Trimethylamine N-Oxide Generated by the Gut Microbiota Is Associated with Vascular Inflammation: New Insights into Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2020, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/4634172>

147. Lozupone, C.; Knight, R. UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 8228–8235.

148. Lozupone, C.; Lladser, M.E.; Knights, D.; Stombaugh, J.; Knight, R. UniFrac: An Effective Distance Metric for Microbial Community Comparison. *ISME J.* **2011**, *5*, 169–172.

149. Lozynskyi, A.V.; Derkach, H.O.; Zasadko, V.V.; Konechnyi, Y.T.; Finiuk, N.S.; Len, Y.T.; Kutsyk, R.V.; Regeda, M.S.; Lesyk, R.B. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Thiazolo[4,5-b]Pyridine Derivatives. *Biopolym. Cell* **2021**, *37*, 153–164.

150. Lu Z, Ma G, Chen L. De-Ritis Ratio Is Associated with Mortality after Cardiac Arrest. *Dis Markers.* 2020 Nov 4;2020:8826318. doi: 10.1155/2020/8826318. PMID: 33204363; PMCID: PMC7657697.

151. Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Drulis-Kawa, Z., Cater, K., Knežević, P., Winogradow, C., Amaro, K., Jończyk-Matysiak, E., Weber-Dąbrowska, B., Rękas, J., & Górski, A. (2022). Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. *Journal of biomedical science*, *29*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00806-1>

152. Lynch, S.V.; Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2369–2379.

153. Maitra, A., Bates, S., Shaik, M., Evangelopoulos, D., Abubakar, I., McHugh, T. D., Lipman, M., & Bhakta, S. (2016). Repurposing drugs for treatment of tuberculosis: a role for non-steroidal anti-inflammatory drugs. *British medical bulletin*, *118*(1), 138–148. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldw019>

154. Maitra, A., Evangelopoulos, D., Chrzastek, A., Martin, L. T., Hanrath, A., Chapman, E., Hailes, H. C., Lipman, M., McHugh, T. D., Waddell, S. J., & Bhakta, S. (2020). Carprofen elicits pleiotropic mechanisms of bactericidal action with the potential to reverse antimicrobial drug resistance in tuberculosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *75*(11), 3194–3201. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa307>

155. Mäkivuokko, H., Tiihonen, K., Tynkkynen, S., Paulin, L., & Rautonen, N. (2010). The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory

drugs on human intestinal microbiota composition. *The British journal of nutrition*, 103(2), 227–234. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991553>

156. Malik, K., & Dua, A. (2022). Prostaglandins. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

157. Mangiola, F., Nicoletti, A., Gasbarrini, A., & Ponziani, F. R. (2018). Gut microbiota and aging. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(21), 7404–7413. https://doi.org/10.26355/eurrev_201811_16280

158. Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

159. Maria-Nefeli Tsetseri, Alan J Silman, David J Keene, Stephanie G Dakin, The role of the microbiome in rheumatoid arthritis: a review, *Rheumatology Advances in Practice*, Volume 7, Issue 2, 2023, rkad034, <https://doi.org/10.1093/rap/rkad034>

160. Markowiak-Kopeć, P., & Śliżewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 12(4), 1107. <https://doi.org/10.3390/nu12041107>

161. Maseda, D., & Ricciotti, E. (2020). NSAID-Gut Microbiota Interactions. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1153. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01153>

162. Mech, D., Kurowska, A., & Trotsko, N. (2021). The Bioactivity of Thiazolidin-4-Ones: A Short Review of the Most Recent Studies. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11533. <https://doi.org/10.3390/ijms222111533>

163. Mekhleif, Y. O., AboulMagd, A. M., & Gouda, A. M. (2023). Design, Synthesis, Molecular docking, and biological evaluation of novel 2,3-diaryl-1,3-thiazolidine-4-one derivatives as potential anti-inflammatory and

cytotoxic agents. *Bioorganic chemistry*, 133, 106411.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106411>

164. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer / Z. Gao et al. *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00020> (date of access: 07.05.2024).

165. Mohajeri, M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M., Faas, M., & Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European journal of nutrition*, 57(Suppl 1), 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>

166. Moreau, G. B., Ramakrishnan, G., Cook, H. L., Fox, T. E., Nayak, U., Ma, J. Z., Colgate, E. R., Kirkpatrick, B. D., Haque, R., & Petri, W. A., Jr (2019). Childhood growth and neurocognition are associated with distinct sets of metabolites. *EBioMedicine*, 44, 597–606.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.043>

167. Mueller, N. T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z., & Dominguez-Bello, M. G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. *Trends in molecular medicine*, 21(2), 109–117.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002>

168. Muraki, M., Fujiwara, Y., Machida, H., Okazaki, H., Sogawa, M., Yamagami, H., Tanigawa, T., Shiba, M., Watanabe, K., Tominaga, K., Watanabe, T., & Arakawa, T. (2014). Role of small intestinal bacterial overgrowth in severe small intestinal damage in chronic non-steroidal anti-inflammatory drug users. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 49(3), 267–273.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2014.880182>

169. Musunuri, B., & Shetty, S. (2023). Diaphragm disease-When non-steroidal anti-inflammatory drugs bit the small bowel. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 10.1007/s12664-023-01444-7. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1007/s12664-023-01444-7>

170. N.; Zhao, J.; Erf, G.F. Vaccine Immunogenicity versus Gastrointestinal Microbiome Status: Implications for Poultry Production. *Appl. Sci.* 2024, 14, 1240. H

171. Nasrallah, A., Sulpice, E., Kobaisi, F., Gidrol, X., & Rachidi, W. (2022). CRISPR-Cas9 Technology for the Creation of Biological Avatars Capable of Modeling and Treating Pathologies: From Discovery to the Latest Improvements. *Cells*, 11(22), 3615. <https://doi.org/10.3390/cells11223615>

172. Nayfach, S., Shi, Z. J., Seshadri, R., Pollard, K. S., & Kyrpides, N. C. (2019). New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature*, 568(7753), 505–510. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1058-x>

173. Neto, R. G., Neta, M. S., Valeriano, C. A., Neves, R. P., Lacerda, A. M., Ferraz, C. E., Inácio, C. P., Pape, P., Ourliac-Garnier, I., Faria, A. R., Silva, T. G., Pereira, V. R., & Marchand, P. (2023). Antifungal efficacy of imidazo[1,2-*a*]pyrazine-based thiosemicarbazones and thiazolidinediones against *Sporothrix* species. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0044>

174. Nishida, A.; Inoue, R.; Inatomi, O.; Bamba, S.; Naito, Y.; Andoh, A. Gut Microbiota in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Clin. J. Gastroenterol.* **2018**, 11, 1–10.

175. Nishida, Y., Adachi, K., Kasai, H., Shizuri, Y., Shindo, K., Sawabe, A., Komemushi, S., Miki, W., & Misawa, N. (2005). Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'-beta-hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4286–4296. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4286-4296.2005>**Помилка! Джерело п осилання не знайдено.**

176. Noh, A. S. M., Chuan, T. D., Khir, N. A. M., Zin, A. A. M., Ghazali, A. K., Long, I., Ab Aziz, C. B., & Ismail, C. A. N. (2021). Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory

parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis. *PloS one*, 16(12), e0260423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260423>

177. Ohira, H., Tsutsui, W., & Fujioka, Y. (2017). Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis?. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 24(7), 660–672. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17006>

178. Ohno, H., & Satoh-Takayama, N. (2020). Stomach microbiota, *Helicobacter pylori*, and group 2 innate lymphoid cells. *Experimental & molecular medicine*, 52(9), 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00485-8>

179. Ortega-Balleza, Jessica L., Sánchez-Varela, Alejandro, Rodríguez-Luna, Isabel C., & Guo, Xianwu. (2018). Genes de virulencia en *Aeromonas* spp. (Aeromonadales: Aeromonadaceae) aisladas de *Oreochromis* spp. (Perciformes: Cichlidae) para consumo humano en México. *Revista de Biología Tropical*, 66(4), 1606-1613. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32829>

180. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>

181. Paes Leme, R. C., & da Silva, R. B. (2021). Antimicrobial Activity of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Biofilm: Current Evidence and Potential for Drug Repurposing. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707629>

182. Pais, P., Oliveira, J., Almeida, V., Yilmaz, M., Monteiro, P. T., & Teixeira, M. C. (2021). Transcriptome-wide differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Clues on host survival and probiotic activity based on promoter sequence variability. *Genomics*, 113(2), 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.11.034>

183. Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in immunology*, *10*, 277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
184. Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in immunology*, *11*, 906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
185. Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. C., Rice, B. L., DuLong, C., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., & Segata, N. (2019). Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*, *176*(3), 649–662.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.001>
186. Patil, K. R., Mahajan, U. B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S. J., Ojha, S., & Patil, C. R. (2019). Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*, *20*(18), 4367. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00619>
187. Peker, N.; Garcia-Croes, S.; Dijkhuizen, B.; Wiersma, H.H.; van Zanten, E.; Wisselink, G.; Friedrich, A.W.; Kooistra-Smid, M.; Sinha, B.; Rossen, J.W.A.; et al. A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S–23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. *Front. Microbiol.* 2019, *10*, 620. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00620>
188. Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P. A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., Adams, H., van Ree, R., & Stobberingh, E. E. (2007).

Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*, 56(5), 661–667. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.100164>

189. Phylogeography and Ecological Niche Shape the Cichlid Fish Gut Microbiota in Central American and African Lakes / L. Baldo et al. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02372> (date of access: 01.03.2024).

190. Pietrzak, B., Tomela, K., Olejnik-Schmidt, A., Mackiewicz, A., & Schmidt, M. (2020). Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9254. <https://doi.org/10.3390/ijms21239254>

191. Pratap UR, Jawale DV, Bhosle MR, Mane RA, et al. Saccharomyces cerevisiae catalyzed one-pot three component synthesis of 2, 3-diaryl-4-thiazolidinones. *Tetrahedron Letters*. 2011;52(14):1689-1691

192. Proctor L. (2019). Priorities for the next 10 years of human microbiome research. *Nature*, 569(7758), 623–625. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01654-0>

193. Prostaglandin-endoperoxide synthase. In: Schomburg, D., Schomburg, I. (eds) Springer Handbook of Enzymes. Springer Handbook of Enzymes, vol 27. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-30439-8_28

194. Protective effect of nimesulide on the external ear damage induced by staphylococcus aureus inoculation in rats / E. Ertugrul et al. *Medicine Science*. 2021. Vol. 10. P. 577.

195. Radi, Z. A., & Khan, K. N. (2019). Cardio-renal safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of toxicological sciences*, 44(6), 373–391. <https://doi.org/10.2131/jts.44.373>

196. Ram M, Barzilai O, Shapira Y, Anaya JM, Tincani A, Stojanovich L, Bombardieri S, Bizzaro N, Kivity S, Agmon Levin N, et al. Helicobacter

pylori serology in autoimmune diseases - fact or fiction? *Clin Chem Lab Med.* 2013;**51**:1075–1082.

197. Randa I. Farah, Aseil E. Khatib, Hiba J. Abu Ziyad, Dareen K. Jiad, Lara R. Al Qusous, Ali Jamal Ababneh & Salma Ajarmeh (2023) Pattern of use and awareness of side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the Jordanian population, *Annals of Medicine*, 55:2, DOI: [10.1080/07853890.2023.2242248](https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2242248)

198. Ratajczak, W., Rył, A., Mizerski, A., Walczakiewicz, K., Sipak, O., & Laszczyńska, M. (2019). Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta biochimica Polonica*, 66(1), 1–12. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648

199. Rawal, R. K., Tripathi, R., Katti, S. B., Pannecouque, C., & De Clercq, E. (2007). Design, synthesis, and evaluation of 2-aryl-3-heteroaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(4), 1725–1731. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.12.003>

200. Rêgo, M. J. B. d. M., Azoubel-Antunes, A., Bezerra, M. B.-C. F., Pereira, M. C., Silva, J. C. d., Lins, T. U. L. e., Sarinho, E. S. C., Amorim, C. A. d. C., Lima, M. d. C. A. d., Galdino-Pitta, M. R., Pitta, I. d. R., & Pitta, M. G. d. R. (2018). Ability of two new thiazolidinediones to downregulate proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells from children with asthma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(3). <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000300049>

201. Ribeiro, H., Rodrigues, I., Napoleão, L., Lira, L., Marques, D., Veríssimo, M., Andrade, J. P., & Dourado, M. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), pain and aging: Adjusting prescription to patient features. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 150, 112958. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112958>

202. Riccio, P., & Rossano, R. (2020). The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. *FEBS letters*, 594(20), 3262–3271. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13946>

203. Ridlon JM, Ikegawa S, Alves JM, Zhou B, Kobayashi A, Iida T, et al.. Clostridium scindens: A human gut microbe with a high potential to convert glucocorticoids into androgens. *J Lipid Res* (2013) 54(9):2437–49. doi: 10.1194/jlr.M038869
204. Rogers, M. A. M., & Aronoff, D. M. (2016). The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(2), 178.e1–178.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.003>
205. Rosato, A., Altini, E., Sblano, S., Salvagno, L., Maggi, F., de Michele, G., Carocci, A., Clodoveo, M. L., Corbo, F., & Fracchiolla, G. (2021). Synergistic Activity of New Diclofenac and Essential Oils Combinations against Different *Candida* spp. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(6), 688. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060688>
206. Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, et al.. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* (2011) 332(6032):974–7. doi: 10.1126/science.1206095
207. Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (2020). Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chemical reviews*, 120(15), 7592–7641. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00215>
208. Ruiz-Calderon, J. F., Cavallin, H., Song, S. J., Novoselac, A., Pericchi, L. R., Hernandez, J. N., Rios, R., Branch, O. H., Pereira, H., Paulino, L. C., Blaser, M. J., Knight, R., & Dominguez-Bello, M. G. (2016). Walls talk: Microbial biogeography of homes spanning urbanization. *Science advances*, 2(2), e1501061. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501061>
209. Rumynska T. M., Hural A. R., Konechnyi Y. T., Vynnytska R. B., Lozynskyi A. V., Salyha Y. T., Korniychuk O. P., Lesyk R. B. (2021). Microbial

biofilms and some aspects of anti-inflammatory drug use. *Biopolym. Cell.*, 37(4), <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A57>

210. Rumynska, T., & Lavryk, G. (2023). Effect of 4-thiazolidinone derivative and nimesulide on parietal intestinal microbiota of rats during induced inflammation process in vivo. *The Animal Biology*, 25(4), 44–50. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.04.044>

211. Said, M. S., Tirthani, E., & Lesho, E. (2023). *Stenotrophomonas Maltophilia*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

212. Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(9), 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

213. Saxami, G., Kerezoudi, E. N., Eliopoulos, C., Arapoglou, D., & Kyriacou, A. (2023). The Gut-Organ Axis within the Human Body: Gut Dysbiosis and the Role of Prebiotics. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(10), 2023. <https://doi.org/10.3390/life13102023>

214. Sayyed, M., Mokle, S., Bokhare, M., Mankar, A., Surwase, S., Bhusare, S., & Vibhute, Y. (2006). Synthesis of some new 2, 3-diaryl-1, 3-thiazolidin-4-ones as antibacterial agents. *Arkivoc*, 2006(2), 187–192. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0007.221>

215. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 10(4), 655–683.

216. Sencio, V., Machado, M. G., & Trottein, F. (2021). The lung-gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes. *Mucosal immunology*, 14(2), 296–304. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00361-8>

217. Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, *14*(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
218. Shawky, A. M., Abourehab, M. A. S., Abdalla, A. N., & Gouda, A. M. (2020). Optimization of pyrrolizine-based Schiff bases with 4-thiazolidinone motif: Design, synthesis and investigation of cytotoxicity and anti-inflammatory potency. *European journal of medicinal chemistry*, *185*, 111780. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111780>
219. Shehata, E., Parker, A., Suzuki, T., Swann, J. R., Suez, J., Kroon, P. A., & Day-Walsh, P. (2022). Microbiomes in physiology: insights into 21st-century global medical challenges. *Experimental physiology*, *107*(4), 257–264. <https://doi.org/10.1113/EP090226>
220. Singh, R. P., Shadan, A., & Ma, Y. (2022). Biotechnological Applications of Probiotics: A Multifarious Weapon to Disease and Metabolic Abnormality. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *14*(6), 1184–1210. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09992-8>
221. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:145–82. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.145
222. Smith B. J., Miller R. A., Schmidt T. M. *Muribaculaceae* Genomes Assembled from Metagenomes Suggest Genetic Drivers of Differential Response to Acarbose Treatment in Mice. *mSphere*. 2021. Vol. 6, no. 6. URL: <https://doi.org/10.1128/msphere.00851-21>
223. Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*, *69*, 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
224. Sneader W. (2000). The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ (Clinical research ed.)*, *321*(7276), 1591–1594. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7276.1591>

225. Sokol, H.; Pigneur, B.; Watterlot, L.; Lakhdari, O.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Gratadoux, J.-J.; Blugeon, S.; Bridonneau, C.; Furet, J.-P.; Corthier, G.; et al. Faecalibacterium Prausnitzii Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 16731–16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105.37>.

226. Song, S. J., Lauber, C., Costello, E. K., Lozupone, C. A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Knights, D., Clemente, J. C., Nakielny, S., Gordon, J. I., Fierer, N., & Knight, R. (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*, 2, e00458. <https://doi.org/10.7554/eLife.00458>

227. Sonnenberg A. Protective role of Helicobacter pylori against inflammatory bowel disease: a hypothesis. *Pract Gastroenterol*. 2009;33:23–33.

228. Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2019). The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nature reviews. Microbiology*, 17(6), 383–390. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0191-8>

229. Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts-Characteristics and Food Application. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>

230. Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S., & Remick, D. G. (2011). The pathogenesis of sepsis. *Annual review of pathology*, 6, 19–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130327>

231. Stražar, M., Temba, G. S., Vlamakis, H., Kullaya, V. I., Lyamuya, F., Mmbaga, B. T., Joosten, L. A. B., van der Ven, A. J. A. M., Netea, M. G., de Mast, Q., & Xavier, R. J. (2021). Gut microbiome-mediated metabolism effects on immunity in rural and urban African populations. *Nature communications*, 12(1), 4845. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25213-2>

232. Subramanian, S., Huq, S., Yatsunenkov, T., Haque, R., Mahfuz, M., Alam, M. A., Benezra, A., DeStefano, J., Meier, M. F., Muegge, B. D., Barratt,

- M. J., VanArendonk, L. G., Zhang, Q., Province, M. A., Petri, W. A., Jr, Ahmed, T., & Gordon, J. I. (2014). Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*, *510*(7505), 417–421. <https://doi.org/10.1038/nature13421>
233. Sucheta, Tahlan, S., & Verma, P. K. (2017). Biological potential of thiazolidinedione derivatives of synthetic origin. *Chemistry Central journal*, *11*(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0357-2>
234. Surono, I. S., Widiyanti, D., Kusumo, P. D., & Venema, K. (2021). Gut microbiota profile of Indonesian stunted children and children with normal nutritional status. *PloS one*, *16*(1), e0245399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245399>
235. Szóstak, N., Szymanek, A., Havránek, J. *et al.* The standardisation of the approach to metagenomic human gut analysis: from sample collection to microbiome profiling. *Sci Rep* **12**, 8470 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12037-3>
236. Tabatabaeifar F, Isaei E, Kalantar-Neyestanaki D, Morones-Ramírez JR. Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Combinatorial Treatment Formulations of Anti-Inflammatory Drugs—Common Antibiotics against Pathogenic Bacteria. *Pharmaceutics*. 2023; 15(1):4. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010004>
237. Taguchi, Y. H., & Oono, Y. (2005). Relational patterns of gene expression via non-metric multidimensional scaling analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *21*(6), 730–740. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti067>
238. Talbert, M., Close, E., Cooke, A., Garrett, W., & Nashelsky, J. (2019). H. pylori Screening Before Initiation of Long-term NSAIDs. *American family physician*, *99*(12), 783–784.
239. Tallarida, R.J., Murray, R.B. (1987). Litchfield and Wilcoxon I: Confidence Limits of ED50. In: Manual of Pharmacologic Calculations. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4974-0_47,

240. Tanaka, T., Okuyama-Dobashi, K., Motohashi, R., Yokoe, H., Takahashi, K., Wiriyaermkul, P., Kasai, H., Yamashita, A., Maekawa, S., Enomoto, N., Ryo, A., Nagamori, S., Tsubuki, M., & Moriishi, K. (2021). Inhibitory effect of a novel thiazolidinedione derivative on hepatitis B virus entry. *Antiviral research*, *194*, 105165. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105165>
241. Tao, L., Rouvière, P. E., & Cheng, Q. (2006). A carotenoid synthesis gene cluster from a non-marine *Brevundimonas* that synthesizes hydroxylated astaxanthin. *Gene*, *379*, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.04.017> ,
242. Tao, S., Chen, H., Li, N., Wang, T., & Liang, W. (2022). The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, *2022*, 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>
243. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J, Pant A, Kircher C, Christy MA, et al.. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and treg function. *Gut Microbes* (2015) *6*(4):234–42. doi: 10.1080/19490976.2015.1056973
244. The Effects of *Lactobacillus johnsonii* on Diseases and Its Potential Applications / Z. Zhang et al. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, no. 10. P. 2580. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102580> (date of access: 23.03.2024).,
245. The Family *Coriobacteriaceae* . In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30138-4_343,
246. Tratat, C., Petrou, A., Geronikaki, A., Ivanov, M., Kostić, M., Soković, M., Vizirianakis, I. S., Theodoroula, N. F., & Haroun, M. (2022). Thiazolidin-4-Ones as Potential Antimicrobial Agents: Experimental and In Silico Evaluation. *Molecules*, *27*(6), 1930. <https://doi.org/10.3390/molecules27061930>

247. Turan-Zitouni, G., Kaplancikli, Z. A., & Ozdemir, A. (2010). Synthesis and antituberculosis activity of some N-pyridyl-N'-thiazolyldiazine derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 45(5), 2085–2088. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.017>
248. Turkevych, N.M.; Vvedenskij, V.M.; Petlichnaya, L.P. Method of Obtaining Pseudothiohydantoin and Thiazolidinedione-2,4. *Ukr.Khim. Zh.* 1961, 27, 680–681, reprinted in *Chem. Abstr.* 1962, 56, 73455.
249. Uzan-Yulzari, A., Turta, O., Belogolovski, A., Ziv, O., Kunz, C., Perschbacher, S., Neuman, H., Pasolli, E., Oz, A., Ben-Amram, H., Kumar, H., Ollila, H., Kaljonen, A., Isolauri, E., Salminen, S., Lagström, H., Segata, N., Sharon, I., Louzoun, Y., Ensenaer, R., ... Koren, O. (2021). Neonatal antibiotic exposure impairs child growth during the first six years of life by perturbing intestinal microbial colonization. *Nature communications*, 12(1), 443. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20495-4>
250. Uzbay T. (2019). Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies. *Current opinion in pharmacology*, 49, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.016>
251. Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
252. Vallejo-Cordoba, B., Castro-López, C., García, H. S., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: A review of current evidence and emerging trends. *Advances in food and nutrition research*, 94, 1–34. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.06.001>
253. van Helden, P. D., van Helden, L. S., & Hoal, E. G. (2013). One world, one health. Humans, animals and the environment are inextricably linked - a fact that needs to be remembered and exploited in our modern approach to health. *EMBO reports*, 14(6), 497–501. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.61>

254. Veerasamy, R., Rajak, H., Jain, A.K., Sivadasan, S., Varghese, C., & Agrawal, R.K. (2011). Validation of QSAR Models-Strategies and Importance.

255. Vieira, R., Souto, S. B., Sánchez-López, E., Machado, A. L., Severino, P., Jose, S., Santini, A., Fortuna, A., García, M. L., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2019). Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome-Review of Classical and New Compounds: Part-I. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 12(4), 152. <https://doi.org/10.3390/ph12040152>

256. Vinayamohan, P. G., Pellissery, A. J., & Venkitanarayanan, K. (2022). Role of Horizontal Gene Transfer in the Dissemination of Antimicrobial Resistance in Food Animal Production. *Current Opinion in Food Science*, 100882. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100882>

257. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratych IB. Laboratory methods of investigation in biology, stock-breeding and veterinary medicine. Lviv, Spolom, 2012: 761p. ISBN 976-966-665-677-6. (in Ukrainian).

258. Wallenborn, J. T., & Vonaesch, P. (2022). Intestinal microbiota research from a global perspective. *Gastroenterology report*, 10, goac010. <https://doi.org/10.1093/gastro/goac010>

259. Wang C, Segal LN, Hu J, Zhou B, Hayes RB, Ahn J, et al.. Microbial risk score for capturing microbial characteristics, integrating multi-omics data, and predicting disease risk. *Microbiome* (2022) 10(1):121. doi: 10.1186/s40168-022-01310-2

260. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267, doi:10.1128/AEM.00062-07.

261. Wang, X., Tang, Q., Hou, H., Zhang, W., Li, M., Chen, D., Gu, Y., Wang, B., Hou, J., Liu, Y., & Cao, H. (2021). Gut Microbiota in NSAID

Enteropathy: New Insights From Inside. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 679396. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.679396>

262. Watanabe, T., Fujiwara, Y., & Chan, F. K. L. (2020). Current knowledge on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small-bowel damage: a comprehensive review. *Journal of gastroenterology*, 55(5), 481–495. <https://doi.org/10.1007/s00535-019-01657-8>

263. Wehamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005;2:406–415.

264. Wu, W. M., Yang, Y. S., & Peng, L. H. (2014). Microbiota in the stomach: new insights. *Journal of digestive diseases*, 15(2), 54–61. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12116>

265. Xu, Y., Zhu, Y., Li, X., & Sun, B. (2020). Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.026>

266. Yang, H. T., Xiu, W. J., Liu, J. K., Yang, Y., Zhang, Y. J., Zheng, Y. Y., Wu, T. T., Hou, X. G., Wu, C. X., Ma, Y. T., & Xie, X. (2022). Characteristics of the Intestinal Microorganisms in Middle-Aged and Elderly Patients: Effects of Smoking. *ACS omega*, 7(2), 1628–1638. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02120>

267. Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., & Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.004>

268. Yin, Z., Liu, X., Qian, C., Sun, L., Pang, S., Liu, J., Li, W., Huang, W., Cui, S., Zhang, C., Song, W., Wang, D., & Xie, Z. (2022). Pan-Genome Analysis of *Delftia tsuruhatensis* Reveals Important Traits Concerning the Genetic Diversity, Pathogenicity, and Biotechnological Properties of the

<https://doi.org/10.1128/spectrum.02072-21>

269. Yoshihara, T., Oikawa, Y., Kato, T., Kessoku, T., Kobayashi, T., Kato, S., Misawa, N., Ashikari, K., Fuyuki, A., Ohkubo, H., Higurashi, T., Tateishi, Y., Tanaka, Y., Nakajima, S., Ohno, H., Wada, K., & Nakajima, A. (2020). The protective effect of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 against mucus degradation by *Akkermansia muciniphila* following small intestine injury caused by a proton pump inhibitor and aspirin. *Gut microbes*, 11(5), 1385–1404.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1758290>

270. Zarghi, A., & Arfaei, S. (2011). Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 10(4), 655–683.

271. Zhang, J.; Song, L.; Wang, Y.; Liu, C.; Zhang, L.; Zhu, S.; Liu, S.; Duan, L. Beneficial Effect of Butyrate-producing Lachnospiraceae on Stress-induced Visceral Hypersensitivity in Rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 34, 1368–1376. <https://doi.org/10.1111/jgh.14536>.]

272. Zhang, M., Feng, R., Yang, M., Qian, C., Wang, Z., Liu, W., & Ma, J. (2019). Effects of metformin, acarbose, and sitagliptin monotherapy on gut microbiota in Zucker diabetic fatty rats. *BMJ open diabetes research & care*, 7(1), e000717. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000717>

273. Zhang, M.; Qiu, X.; Zhang, H.; Yang, X.; Hong, N.; Yang, Y.; Chen, H.; Yu, C. Faecalibacterium Prausnitzii Inhibits Interleukin-17 to Ameliorate Colorectal Colitis in Rats. *PLoS ONE* 2014, 9, e109146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109146>.

274. Zhao, T., Wei, Y., Zhu, Y., Xie, Z., Hai, Q., Li, Z., & Qin, D. (2022). Gut microbiota and rheumatoid arthritis: From pathogenesis to novel therapeutic opportunities. *Frontiers in immunology*, 13, 1007165. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007165>

275. Zheng, Z., Johansson, H., Harvey, N. C., Lorentzon, M., Vandenput, L., Liu, E., Kanis, J. A., & McCloskey, E. V. (2022). Potential Adverse Effect of

Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) on Bisphosphonate Efficacy: An Exploratory Post Hoc Analysis From a Randomized Controlled Trial of Clodronate. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 37(6), 1117–1124.

<https://doi.org/10.1002/jbmr.4548>

276. Zhou, D.; Pan, Q.; Xin, F.-Z.; Zhang, R.-N.; He, C.-X.; Chen, G.-Y.; Liu, C.; Chen, Y.-W.; Fan, J.-G. Sodium Butyrate Attenuates High-Fat Diet-Induced Steatohepatitis in Mice by Improving Gut Microbiota and Gastrointestinal Barrier. *World J. Gastroenterol.* 2017, 23, 60.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i1.60>.

277. Zhu, M., Flynt, L., Ghosh, S., Mellema, M., Banerjee, A., Williams, E., Panettieri, R. A., Jr, & Shore, S. A. (2011). Anti-inflammatory effects of thiazolidinediones in human airway smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(1), 111–119.

<https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0445OC>

278. Zhu, Y., Li, Q., & Jiang, H. (2020e). Gut microbiota in atherosclerosis: focus on trimethylamine N-oxide. *APMIS*, 128(5), 353–366. <https://doi.org/10.1111/apm.13038>

279. Ziesenitz, V. C., Welzel, T., van Dyk, M., Saur, P., Gorenflo, M., & van den Anker, J. N. (2022). Efficacy and Safety of NSAIDs in Infants: A Comprehensive Review of the Literature of the Past 20 Years. *Paediatric drugs*, 24(6), 603–655. <https://doi.org/10.1007/s40272-022-00514-1>

280. Zimmermann, M., Patil, K. R., Typas, A., & Maier, L. (2021). Towards a mechanistic understanding of reciprocal drug-microbiome interactions. *Molecular systems biology*, 17(3), e10116.

<https://doi.org/10.15252/msb.202010116>

281. Zinsstag, J., Mackenzie, J. S., Jeggo, M., Heymann, D. L., Patz, J. A., & Daszak, P. (2012). Mainstreaming one health. *EcoHealth*, 9(2), 107–110.

<https://doi.org/10.1007/s10393-012-0772-8>

282. Войтира.Н. «Синтез та біологічна активність похідних тіазолідину з піридиновим кільцем у молекулах Авт. Реф. дис. Канд. фарм. наук 2017.

283. Державний реєстр лікарських засобів України <http://www.drhz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlz1?opendocument&stype=EFFB318D1C4EC4D6C22588AE004B6003>

284. Компендіум <https://compendium.com.ua/dec/271562>

285. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944. <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10>, <https://rm.coe.int/168007a67b>]

286. Руминська Т. Вплив німесулідну та нового похідного 4-тіазолідинону на гематологічні параметри в умовах експериментального запального процесу. *Біологія тварин*. 2023. Т. 25, № 2. С. 33–36. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.02.033>

287. Стефанов О. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. — Київ: Авіцена; 2001. 528 р.

288. Т. Руминська, І. Юшин, Ю. Конечний Вплив нестероїдного протизапального препарату німесулідну та нового похідного 4-тіазолідинону на мікробіоту товстої кишки. XXI All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists, Lviv, Ukraine, May 18th–19th 2023 С.75

289. Хилюк, Д. (2019). *Синтез, перетворення та біологічна активність 2,3-диарил(гетерил) 4-тіазолідонів*. ЛНМУ імені Данила Галицького.

290. Юшин І. Синтез та біологічна активність похідних тіазолідину з піразоліновим фрагментом у молекулах : дис. Д-ра філософії в галузі фармацевтики : 226. Львів, 2023. 237 с., Clavel, T., Lepage, P., Charrier, C. (2014).

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Rumynska, T. M., Hural, A. R., Konechnyi, Y. T., Vynnytska, R. B., Lozynskyi, A. V., Salyha, Y. T., Korniychuk, O. P., & R.B. Lesyk. (2021). Microbial biofilms and some aspects of anti-inflammatory drug use. *Biopolymers and Cell*, 37(4), 247–258. <https://doi.org/10.7124/bc.000a57> (Scopus Q4). (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у написання та оформлення публікації).
2. Руминська Т. Вплив німесуліді та нового похідного 4-тіазолідинону на гематологічні параметри в умовах експериментального запального процесу. *Біологія тварин*. 2023. Т. 25, № 2. С. 33–36. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.02.033> (фахове наукове видання України). (Особистий внесок здобувачки: участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
3. Rumynska, T., & Lavryk, G. (2023). Effect of 4-thiazolidinone derivative and nimesulide on parietal intestinal microbiota of rats during induced inflammation process in vivo. *The Animal Biology*, 25(4), 44–50. <https://doi.org/10.15407/animbiol25.04.044> (фахове наукове видання України) (Особистий внесок здобувачки: ідея проведення досліджень, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
4. Konechnyi Y, Rumynska T, Yushyn I, Holota S, Turkina V, Ryviuk Rydel M, Sękowska A, Salyha Y, Korniychuk O, Lesyk R. A New 4-Thiazolidinone Derivative (Les-6490) as a Gut Microbiota Modulator: Antimicrobial and Prebiotic Perspectives. *Antibiotics*. 2024; 13(4):291. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040291> (Scopus Q1-Q2) (Особистий внесок здобувачки: ідея проведення досліджень, участь у

виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

5. T.Rumynska, I.Yushyn, S.Holota, Adriana Hural, D.Mural, O.Dudok, Y. Salyha, V. Georgiyants, O.Korniychuk, R. Lesyk, Y. Konechnyi. Comparative characteristics of the anti-inflammatory effect of the 4-thiazolidinone derivative Les- 6490 and Nimesulide under the conditions of Freund's adjuvant-induced inflammatory process in rats. *Biopolymers and Cell* (прийнято до друку станом на 12.01.2024 (Scopus Q4)).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Руминська Т.М., Корнійчук О.П. До питання мікробіологічної діагностики мікробних процесів у ротовій порожнині. «Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній і клінічній лабораторній медицині» 2020 р. С.36. Дніпро, Україна.

2. T. Rumynska A. Hural, Y. Salyha. Influence of NSAIDs on the microbiocenosis of the oral cavity in animals. The first ukrainian-polish scientific forum agrobioperspectives. 29–30 September 2021, Lviv, Ukraine .

3. Konechnyi, Y., Rumynska, T., Yushyn, I. and Lesyk, R., 2022. Newly synthesized 5-pyrazolyl substituted 2,4-thiazolidinedione as potential anti-inflammatory and antimicrobial agent. ESCMID-ASM Joint Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, Dublin, Ireland, 4-7 October 2022, <https://www.escmid.org/dates-events/escmid-conferences/escmidasm-conference-2022>.

4. Гураль А., Руминська Т., Мельник О., Павляк У., Конечний Ю. Взаємодія адгезивних властивостей бактерій із компонентами формування біоплівки. Збірник наукових матеріалів XXIV міжнародної науково-практичної інтернет конференції el-conf.com.ua Новини науки XXI століття. м. Вінниця 2019. с.113-117.

5. Rumynska T., Melnyk O., Pavliak U., Hural A. The connection mechanism of co-operations of biofilm microorganisms and antibiotic resistance. RS Clobal International trends in science and technology Poland. 2019.

6. М. Сус, Т. Руминська, І. Коваленко. Мікробіом та інтерлейкіновий профіль при запальних захворюваннях шлунково-кишкового тракту. Українські медичні. XIX конгрес світової федерації українських лікарських товариств. Українські медичні вісті, 27–29.10.2022 С 140-141

7. Т. Руминська, І. Юшин, Ю. Конечний. Вплив нестероїдного протизапального препарату німесулідіду та нового похідного 4-тіазолідинону на мікробіоту товстої кишки. XXI All-Ukrainian Scientific and Practical Conference of Young Scientists, Lviv, Ukraine, May 18th–19th 2023 С.75.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи було представлено на науково-практичних конференціях:

- XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича ШАВКУНА, Львів 2023 р.;
- ESCMID-ASM Joint Conference on Drug Development to Meet the Challenge of Antimicrobial Resistance, Dublin, Ireland (4-7 October 2022);
- XIX Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (СФУЛТ), Ужгород (27–29.10.2022);
- The 1st Ukrainian-Polish Scientific Forum "AGROBIOPERSPECTIVES" in Lviv (15-16 вересня 2021 р).
- Науково-практична конференція присвяченої пам'яті відомого вченого-мікробіолога, доктора медичних наук, професора І.Л. Дикого, Харків (19 березня 2020 р.);
- XXIV міжнародної науково-практичної інтернет конференції eI- conf.com.ua. Новини науки XXI століття. м. Вінниця, 2019.
- Звітні конференції аспірантів ІБТ НААН України (Львів 2020, 2021, 2022, 2023, 2024 рр.).

Прогнозування мішеней біоактивних молекул

SwissTargetPrediction

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Dual specificity phosphatase Cdc25B	CDC25B	P30305	CHEMBL4804	Phosphatase	0.197669261928	18 / 1
Dual specificity phosphatase Cdc25A	CDC25A	P30304	CHEMBL3775	Phosphatase	0.0972399887602	11 / 4
Plectin	PLEC	Q15149	CHEMBL1293240	Unclassified protein	0.0972399887602	6 / 1
Histone deacetylase 2	HDAC2	Q92769	CHEMBL1937	Eraser	0.0972399887602	24 / 16
PTPsigma-(Brain)	PTPsigma	Q9UM81	CHEMBL2146342	Unclassified protein	0.0972399887602	0 / 1
Dual specificity protein phosphatase 3	DUSP3	P51452	CHEMBL2635	Phosphatase	0.0972399887602	6 / 9
Histone deacetylase 1	HDAC1	Q13547	CHEMBL325	Eraser	0.0972399887602	62 / 16
Sodium channel protein type IX alpha subunit	SCN9A	Q15858	CHEMBL4296	Voltage-gated ion channel	0.0972399887602	786 / 0
11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1	HSD11B1	P28845	CHEMBL4235	Enzyme	0.0972399887602	160 / 0
Aldo-keto-reductase family 1 member C3	AKR1C3	P42330	CHEMBL4681	Enzyme	0.0972399887602	50 / 0
Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2	TDP2	O95551	CHEMBL2169736	Enzyme	0.0972399887602	14 / 0
Phosphodiesterase 10A	PDE10A	Q9Y233	CHEMBL4409	Phosphodiesterase	0.0972399887602	582 / 0
Serine/threonine-protein kinase Aurora-B	AURKB	Q96GD4	CHEMBL2185	Kinase	0.0972399887602	72 / 0
Ribosomal protein S6 kinase 1	RPS6KB1	P23443	CHEMBL4501	Kinase	0.0972399887602	39 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK3	JAK3	P52333	CHEMBL2148	Kinase	0.0972399887602	153 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK1	JAK1	P23458	CHEMBL2835	Kinase	0.0972399887602	138 / 0
Protein-tyrosine phosphatase LC-PTP	PTPN7	P35236	CHEMBL2219	Phosphatase	0.0972399887602	0 / 5
DNA-dependent protein kinase	PRKDC	P78527	CHEMBL3142	Kinase	0.0972399887602	200 / 0
Dual specificity protein kinase CLK4	CLK4	Q9HAZ1	CHEMBL4203	Kinase	0.0972399887602	27 / 0
Prostanoid EP3 receptor	PTGER3	P43115	CHEMBL3710	Family A G protein-coupled receptor	0.0972399887602	210 / 0
Serine/threonine-protein kinase GAK	GAK	O14976	CHEMBL4355	Kinase	0.0972399887602	10 / 0

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Protein-tyrosine phosphatase 1B	PTPN1	P18031	CHEMBL335	Phosphatase	0.0972399887602	34 / 8
Serine/threonine-protein kinase mTOR	MTOR	P42345	CHEMBL2842	Kinase	0.0972399887602	259 / 0
Sigma opioid receptor	SIGMAR1	Q99720	CHEMBL287	Membrane receptor	0.0972399887602	47 / 0
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	P14174	CHEMBL2085	Enzyme	0.0972399887602	2 / 0
Nerve growth factor receptor Trk-A	NTRK1	P04629	CHEMBL2815	Kinase	0.0972399887602	143 / 0
Serine-protein kinase ATM	ATM	Q13315	CHEMBL3797	Kinase	0.0972399887602	6 / 0
Aldo-keto reductase family 1 member C2	AKR1C2	P52895	CHEMBL5847	Enzyme	0.0972399887602	1 / 0
Casein kinase I delta	CSNK1D	P48730	CHEMBL2828	Kinase	0.0972399887602	8 / 0
Casein kinase I epsilon	CSNK1E	P49674	CHEMBL4937	Kinase	0.0972399887602	4 / 0
C-C chemokine receptor type 9	CCR9	P51686	CHEMBL5815	Family A G protein-coupled receptor	0.0972399887602	21 / 0
Poly [ADP-ribose] polymerase-1	PARP1	P09874	CHEMBL3105	Enzyme	0.0972399887602	68 / 0
5-lipoxygenase activating protein	ALOX5AP	P20292	CHEMBL4550	Other cytosolic protein	0.0972399887602	48 / 0
Protein Wnt-3a	WNT3A	P56704	CHEMBL1255137	Unclassified protein	0.0972399887602	24 / 0
Histone acetyltransferase p300	EP300	Q09472	CHEMBL3784	Writer	0.0972399887602	2 / 0
Histone acetyltransferase PCAF	KAT2B	Q92831	CHEMBL5500	Writer	0.0972399887602	2 / 0
Tankyrase-2	TNKS2	Q9H2K2	CHEMBL6154	Enzyme	0.0972399887602	34 / 0
Purinergic receptor P2Y12	P2RY12	Q9H244	CHEMBL2001	Family A G protein-coupled receptor	0.0972399887602	23 / 0
Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1	MCL1	Q07820	CHEMBL4361	Other cytosolic protein	0.0972399887602	22 / 0
Apoptosis regulator Bcl-X	BCL2L1	Q07817	CHEMBL4625	Other ion channel	0.0972399887602	12 / 0
Beta-secretase 1	BACE1	P56817	CHEMBL4822	Protease	0.0972399887602	285 / 0
Histamine H3 receptor	HRH3	Q9Y5N1	CHEMBL264	Family A G protein-coupled receptor	0.0972399887602	16 / 0
Intercellular adhesion molecule-1	ICAM1	P05362	CHEMBL3070	Adhesion	0.0972399887602	12 / 0
Cytochrome P450 17A1	CYP17A1	P05093	CHEMBL3522	Cytochrome P450	0.0972399887602	61 / 0
Vascular cell	VCAM1	P19320	CHEMBL3735	Adhesion	0.0972399887602	3 / 0

Результати дослідження протимікробної та протигрибкової дії синтезованих молекул (d затримки росту, мм)

Сполука	Грам (-)				Грам (+)			Грибки		
	Референтні штами		Клінічні штами		Референтні штами		Клінічні штами	Референтні штами	Клінічні штами	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257	<i>Klebsiella pneumoniae</i> N189	<i>Aeromonas hydrophila</i> N196	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp.	<i>Staphylococcus aureus</i> N23	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	<i>Candida albicans</i> N67	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> N84
2.10	н/д	0,0	0,0	н/т	н/д	0,0	8,0	0,0	0,0	н/д
2.11	н/д	10,0	0,0	н/д	н/д	0,0	0,0	0,0	30,0	н/д
2.12	н/д	0,0	0,0	н/д	н/д	0,0	0,0	0,0	25,0	н/д
2.13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	0,0
2.15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,6	0,0	25,0	н/д	12,8

2.19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	н/д	18,3
2.26	7,0	0,0	0,0	0,0	22,9	17,5	13,4	н/д	20,0	н/д
2.36	7,0	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	14,0
2.37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0	н/д	15,2
2.39	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	19,0	н/д	н/д
2.40(Les-6490)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	0,0	20,0	22,0	25,8
2.42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	0,0
2.43	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	22,0	14,9
2.49	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,0	0,0	н/д	25,0	н/д
2.53	7,0	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	н/д	0,0

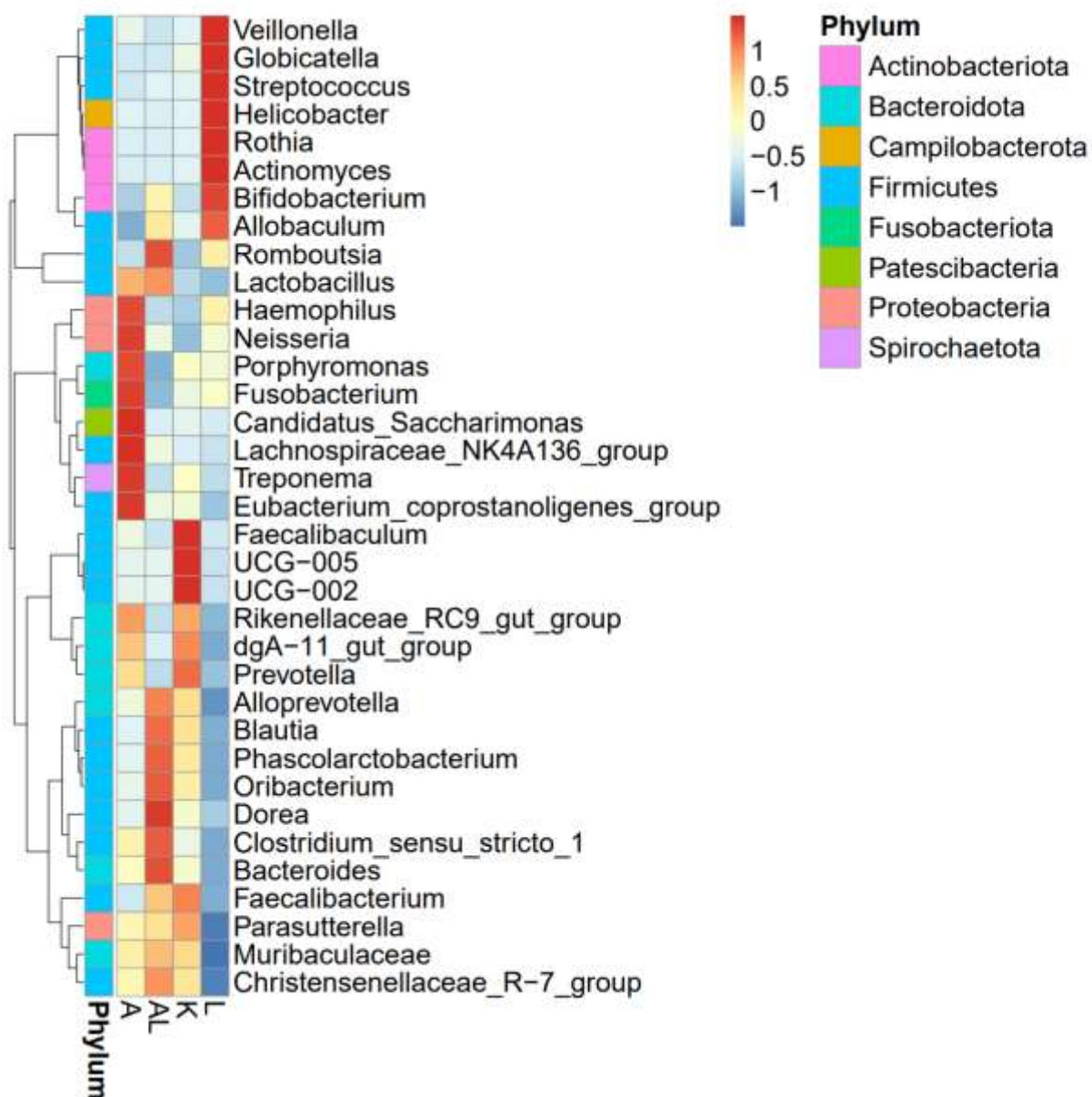
2.55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	19,0	0,0
2.57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	н/д	16,7
Контроль (ДМСО)	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	18,0	17,0
Vancomycin	н/д	н/д	н/д	н/д	32,0	32,0	11,4	н/д	н/д	н/д
Ciprofloxacin	35,0	42,0	20,0	27,0	н/д	35,0	9,0	н/д	н/д	н/д
Clotrimazole	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	18,0	11,0	10,0

*похибка складала $\pm 0.1-0.6$ мм; н/д-не досліджено, Ванкоміцин 30 г (зона затримки росту 17–21 мм для *S. aureus*);

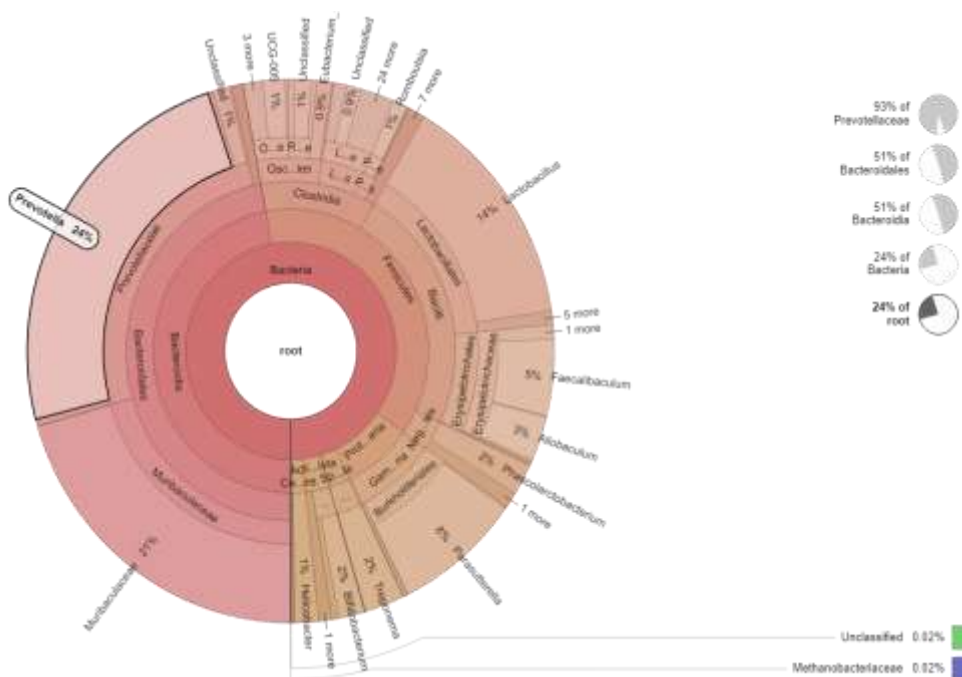
Ципрофлоксацин 5 г (зона затримки росту 25–33 мм для *P. aeruginosa*, 22–30 мм для *S. aureus*, 30–40 мм для *E.coli*);

Клотримазол 10 г (зона затримки росту 12–17мм для *Candida spp*; діаметр лунки 5,5 мм

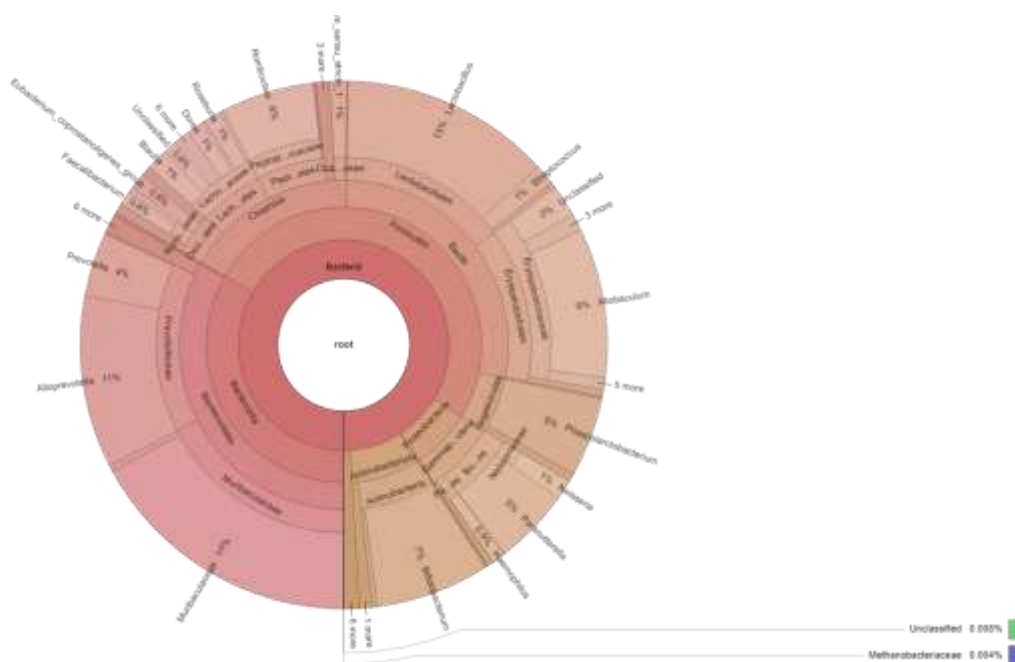
Теплова карта таксономічної чисельності досліджуваних груп (Рід)



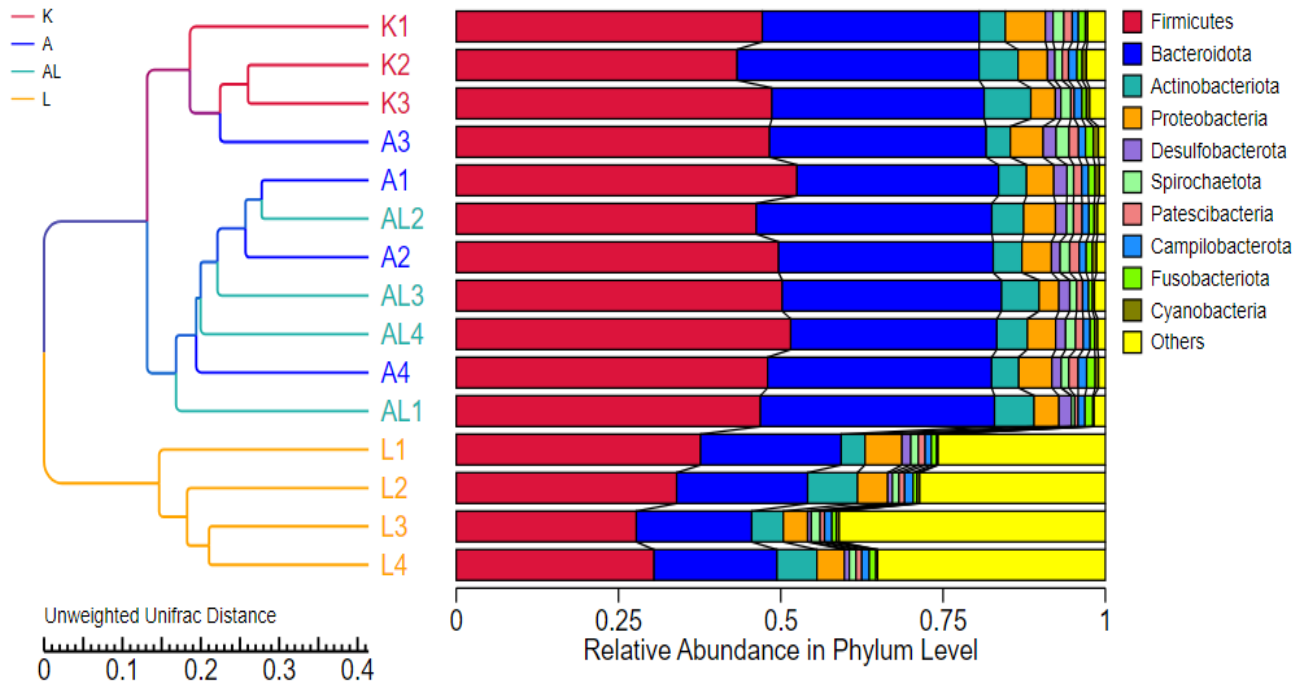
Біорізноманіття мікрофлори кишкового каналу щурів групи (К)



Біорізноманіття мікрофлори кишкового каналу щурів групи AL(індуковане запалення та вплив сполуки Les-6490)



Бета-різноманітність кишкового каналу досліджуваних груп.



ПОДЯКИ

Висловлюю вдячність доценту кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького, Конечному Юліану, за допомогу у проведенні мікробіологічних досліджень, підтримку в підготовці рукописів, консультуванні та всебічну підтримку у формуванні мене, як науковця.

Висловлюю подяку асистенту Юшину Ігорю та професору Лесику Роману Богдановичу, працівникам кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького, за синтез сполук похідних 4- тiazолідинонів.

Висловлюємо вдячність працівникам НДІ епідеміології та гігієни ЛНМУ імені Данила Галицького за допомогу з проведенням експериментальних досліджень на тваринах.

Висловлюю подяку своїм науковим керівникам, професорці Корнійчук Олені Петрівні та члену-кореспонденту НААН Сализі Юрію Тарасовичу, за участь у формуванні мене, як науковця, та за всебічну підтримку під час написання рукопису дисертації.