

Міністерство охорони здоров'я України
Вінницький національний медичний університет
імені М.І. Пирогова

На правах рукопису

ТАРАН Ілля Васильович

УДК: 615.355:516.22:616.61.612.014.1

**МОДУЛЯЦІЯ ГАСТРОТОКСИЧНОСТІ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ ЗА
УМОВ РІЗНОГО РІВНЯ НАСИЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ
ГІДРОГЕН СУЛЬФІДОМ
(експериментальне дослідження)**

14.03.05 - фармакологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник:
доктор медичних наук,
професор
Волощук Наталія Іванівна

Вінниця - 2016

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1 РОЛЬ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В РЕАЛІЗАЦІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ЕФЕКТУ ТА ТОКСИЧНОСТІ НПЗЗ (щгляд літератури)	15
1.1. Нестероїдні протизапальні засоби: фармакодинаміка та механізми дії.....	15
1.2. Гастротоксичність НПЗЗ, механізми її розвитку та сучасні підходи до профілактики.....	18
1.3. Метаболізм та біологічні ефекти гідроген сульфідy.....	23
1.4. Вплив гідроген сульфідy на фармакологічний ефект та токсичність НПЗЗ.....	29
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
2.1. Вибір доз досліджуваних сполук та визначення параметрів гострої токсичності у щурів та мишей.....	42
2.2. Моделі надлишку та дефіциту гідроген сульфідy у тварин..	45
2.3. Дослідження гастротоксичної дії диклофенаку натрію, NaHS, ППГ та їх комбінацій	46
2.4. Експериментальні моделі оцінки антиноцицептивної та антифлогогенної дії диклофенаку натрію, NaHS, ППГ та їх комбінацій	48
2.5. Біохімічні методи дослідження	51
2.6. Методика реєстрації скоротливості гладком'язових препаратів мезентеріальних артерій.....	53
2.7. Цитометричні методи дослідження.....	54
2.8. Методи статистичної обробки результатів.....	56

РОЗДІЛ 3	РОЛЬ МОДУЛЮВАННЯ ВМІСТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У РЕАЛІЗАЦІЇ ЗАХИСНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ.....	58
3.1.	Дослідження макроскопічного стану слизової оболонки шлунку на тлі модулювання рівня гідроген сульфід у інтактних щурів.....	59
3.2.	Оцінка впливу надлишку та дефіциту гідроген сульфід на зміни біохімічних маркерів стану слизової оболонки шлунку інтактних щурів.....	62
3.3.	Оцінка впливу надлишку та дефіциту гідроген сульфід на продукцію вазоактивних молекул (гідроген сульфід, нітроген монооксиду та простагландинів) в шлунку інтактних щурів.....	67
3.4.	Дослідження впливу донору гідроген сульфід та пропаргілгліцину на зміни чутливості кільцевих фрагментів мезентеріальних артерій інтактних щурів до дії вазодилататорів	70
3.5.	Вивчення впливу донору гідроген сульфід та пропаргілгліцину на зміни клітинного циклу та процеси апоптозу в тканинах шлунку інтактних щурів.....	72
РОЗДІЛ 4	ЗМІНИ ЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ ЩУРІВ З ГАСТРОПАТІЄЮ, ІНДУКОВАНОЇ ДИКЛОФЕНАКОМ НАТРІЮ, ЗА УМОВ РІЗНОГО ВМІСТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ.....	78
4.1.	Дослідження макроскопічного стану слизової оболонки шлунку, секреторної та моторно-евакуаторної функції ШКТ на тлі модулювання рівня гідроген сульфід за умов диклофенак-індукованої гастропатії.....	79
4.2.	Оцінка впливу надлишку та дефіциту гідроген сульфід на зміни біохімічних маркерів стану слизової оболонки	

шлунку на тлі введення диклофенаку натрію.....	86
4.3. Дослідження впливу донору гідроген сульфідів та пропаргілгліцину на індуковані диклофенаком зміни продукції вазоактивних медіаторів (гідроген сульфідів, простагландинів, нітроген монооксиду) в шлунку щурів..	91
4.4. Дослідження впливу донору гідроген сульфідів та пропаргілгліцину на індуковані диклофенаком зміни чутливості кільцевих фрагментів мезентеріальних артерій до дії вазодилататорів.....	94
4.5. Вплив донору гідроген сульфідів на індуковані диклофенаком зміни клітинного циклу та процесів апоптозу в тканинах шлунку	97
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ НАДЛИШКУ ТА ДЕФІЦИТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА БАЗОВІ ФАРМАКОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ.....	105
5.1. Дослідження анальгезуючої та протизапальної дії натрій гідроген сульфідів та пропаргілгліцину.....	106
5.2. Дослідження змін анальгезуючого та протизапального ефектів диклофенаку натрію на тлі модулювання обміну гідроген сульфідів.....	110
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	116
ВИСНОВКИ.....	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВІ – виразковий індекс
ГАГ – глікозаміноглікани
ГПО – глутатіонпероксидаза
ЕС – ефективна концентрація
НО-синтаза - синтаза нітроген монооксиду
КГП – карбонільні групи протеїнів
ЛТ – лейкотрієни
МДА – малоновий діальдегід
НАДФН-оксидаза
НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби
ППГ - пропаргілгліцин
ПБЧ – поріг больової чутливості
ПГ – простагландини
РGN-синтаза – простагландин-Н-синтаза
СУР450 – цитохром Р 450
СОД - супероксиддисмутаза
СОШ – слизова оболонка шлунку
ФЛ – фосфоліпіди
ФХ - фосфатидилхолін
ФЕ - фосфатидилетаноламін
ЛФХ - лізофосфатидилхолін
ЦОГ – циклооксигеназа
ЦГЛ – цистатіонін гама-ліаза
ЦБС – цистатіонін бета-синтаза

ВСТУП

Актуальність проблеми

Ефективність нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) в лікуванні різноманітних захворювань в сучасній медичній практиці не викликає сумнівів. Вагомим фактором, який обмежує застосування НПЗЗ, є ризик розвитку ускладнень верхніх відділів шлунково-кишкового тракту, серед яких найбільш загрозливими є виразкові кровотечі та перфорації, які часто призводять до летальності хворих [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. НПЗЗ займають другу сходинку за частотою зареєстрованих в Україні побічних реакцій, поступаючись лише антибактеріальним засобам для системного застосування. НПЗЗ зумовлюють 48,7% всіх небажаних ефектів фармакотерапії, з них більше 90,0 % - ускладнення з боку шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Частка побічних реакцій, які викликають НПЗЗ складає 20–25%, і серед них гастроінтестинальну токсичність виявляють у 52,5 % випадків [9, 10, 11, 12].

У механізмах розвитку НПЗЗ-індукованих гастропатій провідна роль належить зниженню продукції захисного шару слизу, порушенню прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, зменшенню продукції нітроген монооксиду (NO), простагландинів та інших вазоактивних речовин. На практиці застосовують кілька шляхів профілактики розвитку гастроінтестинальних ускладнень: одночасний прийом інгібіторів протонної помпи, аналогів простагландину E_2 , блокаторів H_2 -гістаміно рецепторів, тощо. Однак жодний з цих засобів не вирішує проблеми безпеки лікування НПЗЗ [6, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Тому завдання профілактики та лікування НПЗЗ-гастропатій на сьогоднішній день не можна вважати остаточно вирішеним [4, 15, 24, 25, 26, 27]. На сьогодні відомо, що однією з основних ланок у патогенезі розвитку НПЗЗ-гастропатії є дисбаланс у

співвідношенні вазоконстрикторів та вазодилататорів, який виникає в ряді випадків застосування НПЗЗ [28, 29]. Тому нашу увагу привернуло вивчення вазоактивних медіаторів, які мають потужний вплив на судинний тонус.

Поряд з відомими «газовими» регуляторами судинного тонусу нітроген монооксидом (NO) та карбон монооксидом (CO), все більше уваги дослідників привертає біологічно активна молекула - гідроген сульфід (H_2S), котрий, як і NO та CO володіє виразною судинорозширюючою дією [30, 31, 32]. Вазорелаксуючий ефект H_2S опосередковується через активацію АТФ-чутливих калієвих каналів в клітинах гладенької мускулатури судин, нейронах, кардіоміоцитах і β -клітинах підшлункової залози [33, 34, 35]. Окрім регуляції судинного тонусу, H_2S бере участь в забезпеченні скоротливості міокарда, нейротрансмісії та ін. Описана суттєва роль H_2S в регуляції моторики ШКТ, секреції інсуліну, продукції жовчі [36, 37, 38]. Зміни вмісту H_2S в організмі можуть виникати внаслідок застосування лікарських засобів та наявності у пацієнта патологічних станів та захворювань. Так, серед засобів, що підвищують вміст H_2S в тканинах, описані натрію тіосульфат, леводопа, сілденафіл, аторвастатін, карведілол, дігосин, раміприл, метформін, вітамінні комплекси (есмін). Зниження вмісту цього газотрансміттера може бути наслідком впливу НПЗЗ, парацетамолу (в мозку), амлодипіну, цисплатину, та ін. [22, 39, 40, 41, 42, 43]. Нестача H_2S асоціюється з легеневою гіпертензією, хворобою Альцгеймера, цирозом печінки, міокардіальною ішемією, атеросклерозом, гіпергомоцистеїнемією тощо. З іншого боку, надмірна продукція H_2S залучена в патогенезі запальних захворювань, септичного шоку, мозкового інсульту, та ін. Лікування вищезазначених станів може супроводжуватись одночасним використанням НПЗЗ. Однак, на сьогодні залишається невідомим, в якій мірі терапевтичні та небажані ефекти НПЗЗ, зокрема гастротоксичність, реалізуються через вплив на систему продукції H_2S . Наведені вище дані вказують на перспективність подальшого

поглибленого вивчення ролі H_2S в якості модулятора гастротоксичної дії та фармакологічного профілю НПЗЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Тема дисертації та основні напрямки її виконання обговорені та затверджені Проблемною комісією МОЗ і АМН України «Фармакологія» (протокол №5 від 30.01.2012 року). Дисертаційна робота виконана в рамках плану науково-дослідних робіт Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, затверджених МОЗ України: «Дослідження впливу деяких екзогенних та ендогенних чинників на біотрансформацію, фармакологічний ефект та токсичність лікарських засобів (№ держреєстрації 0106U005135), та “Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфідом та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології” (№ держреєстрації - 0113U006461). Автор є співвиконавцем зазначених тем.

Мета роботи - експериментальне обґрунтування нових підходів до зменшення гастротоксичності диклофенаку натрію на основі вивчення змін захисних властивостей слизової оболонки шлунка (СОШ) та фармакодинамічних ефектів цього НПЗЗ за умов різної насиченості організму гідроген сульфідом.

Завдання дослідження:

1. Дослідити гостру токсичність донора гідроген сульфідом - $NaHS$ при внутрішньоочеревинному та в/шл введенні у щурів та мишей.
2. Оцінити макроскопічний стан СОШ, секреторної та моторно-евакуаторної функції ШКТ на тлі модулювання вмісту H_2S за умов диклофенак-індукованої гастропатії.
3. Визначити біохімічні параметри, які характеризують стан СОШ (вміст глікозаміногліканів (ГАГ), фосфоліпідів (ФЛ), малонового

діальдегіду (МДА), карбонільних груп протеїнів (КГП), активності супероксиддисмутази (СОД), НАДФН-оксидази) на тлі модулювання вмісту H_2S та їх зміни за умов введення диклофенаку натрію, його комбінації з донором гідроген сульфїду NaHS та інгібітором його синтезу пропаргілгліцином (ППГ).

4. Оцінити вплив дефіциту та надлишку H_2S на індуковані диклофенаком зміни активності H_2S -продукуючих ензимів (цистатіонін-гама-ліази (ЦГЛ), простагландин- H -синтази (PGH-синтази), NO-синтази та чутливості мезентеріальної артерії до дії вазоактивних медіаторів.

5. Визначити зміни клітинного циклу та фрагментацію ДНК в СОШ щурів за умов введення диклофенаку натрію, NaHS при їх ізольованому та сумісному введенні.

6. Дослідити вплив дефіциту та надлишку H_2S на протизапальний та анальгезуючий ефекти диклофенаку натрію.

Об'єкт дослідження: гастротоксичність та фармакологічні ефекти диклофенаку натрію на тлі дефіциту й надлишку H_2S .

Предмет дослідження: макроскопічні, біохімічні та цитометричні показники стану СОШ, гостра токсичність сполук, оцінка протизапальної, анальгезуючої дії.

Методи дослідження: токсикологічні (визначення LD_{50}), фармакологічні (визначення анальгезуючої та протизапальної дії), макроскопічні показники гастротоксичності, патофізіологічні (створення дефіциту та надлишку гідроген сульфїду), біохімічні (показники стану СОШ, маркери оксидантно-антиоксидантного гомеостазу, продукція вазоактивних молекул в СОШ, рівень H_2S та активність ЦГЛ), фізіологічні (оцінка скоротливої здатності ізольованих сегментів судин), метод протокової цитометрії (оцінка змін клітинного циклу, фрагментації ДНК),

статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше встановлено показники гострої токсичності донору гідроген сульфїду (NaHS) у щурів та мишей за умов внутрішньочеревного (в/оч) та внутрішньошлункового (в/шл) введення, визначено умовно-терапевтичну дозу цієї сполуки, а також встановлено відсутність негативного впливу її в дозі 1/20 ЛД₅₀ на токсикометричні параметри диклофенаку натрію у щурів.

Уточнено та доповнено дані про роль різного вмісту H₂S в організмі в забезпеченні захисних систем СОШ від пошкоджуючої дії диклофенаку натрію. Встановлено, що NaHS вірогідно в 1,8 рази зменшував, а ППГ – в 1,6 рази збільшував виразковий індекс диклофенаку натрію. NaHS зменшував інтенсивність процесів ліпопероксидації та окисної деструкції білків (вміст МДА, КГП та активність НАДФН-оксидази зменшувались на 19,4, 17,1 та 14,3%, відповідно), викликав зростання антиоксидантного потенціалу, підвищував активності простагландин-Н-синтази, NO-синтази, а також збільшував чутливість мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H₂S (вірогідно зменшення EC₅₀ H₂S на 27,2%, порівняно з контролем). Дефіцит H₂S в організмі викликав протилежні зміни та погіршував «опірність» слизової шлунку, стимулював процеси оксидативного та нітрозативного стресу, зменшував продукцію вазодилатуючих молекул та погіршував чутливість мезентеріальних судин до дії релаксуючих факторів.

Дістало подальший розвиток комплексне вивчення впливу диклофенаку натрію на тлі модулювання обміну H₂S на передепітеліальні, епітеліальні та постепітеліальні рівні «захисту» СОШ, макроскопічні та біохімічні показники гастротоксичності. Проведений кореляційний аналіз залежності ушкодження СОШ на тлі введення досліджуваного НПЗЗ від рівня H₂S в організмі. Показано, що рівень H₂S в сироватці крові позитивно корелював з вмістом ГАГ (r=0,53, p<0,05), фосфатидилхоліном (r=0,47, p<0,05), активністю СОД (r=0,60, p<0,05), NO-синтази (r=0,58,

$p < 0,05$), PGH-синтази ($r = 0,60$, $p < 0,05$), а також активністю ЦГЛ ($r = 0,74$, $p < 0,05$) та вмістом H_2S в СОШ ($r = 0,76$, $p < 0,05$). Обернені кореляційні зв'язки між рівнем H_2S встановлені для показників ураження СОШ за умов введення диклофенаку натрію. В роботі вперше показано відсутність впливу донору H_2S за умов в/шл введення на загальну кислотність шлункового соку та його здатність викликати вірогідне (на 25,7%) зниження моторики кишечника тварин. 5-ти денне в/шл сумісне введення NaHS разом з диклофенаком натрію нівелювало зміни моторної функції ШКТ, викликані цим НПЗЗ.

Уточнено дані щодо впливу донору H_2S на базові фармакологічні ефекти диклофенаку натрію: курсове в/оч введення NaHS в дозі $1/20 LD_{50}$ щурам проявляло антиноцицептивну активність в умовах експериментального запального процесу, а також протизапальну дію. Антиексудативна активність диклофенаку натрію на тлі додаткового введення NaHS становила 81,9 та 67,5% за умов карагенінового та формалінового набряків, відповідно, проти 54,9 та 38,%, відповідно, при монотерапії НПЗЗ. Також виявлено підвищення антиноцицептивної активності диклофенаку натрію за умов надлишку H_2S в організмі.

Досліджені *in vivo* зміни клітинного циклу, фрагментації ДНК в шлунку доповнили дані щодо захисної дії H_2S за умов диклофенак-індукованого апоптозу в СОШ (показник фрагментації ДНК був вірогідно ($p < 0,05$) в 1,68 рази меншим, а показники фази синтезу (S-фази) і блоку проліферації – в 1,7 та 2,5 рази відповідно, більшими, порівняно з монотерапією диклофенаком.

Наукова новизна роботи підтверджена 3-ма патентами України на корисну модель (№ u201414057, № u201414058 та № u201500096).

Практичне значення одержаних результатів

В роботі доведено спроможність H_2S зменшувати гастротоксичність диклофенаку натрію. Встановлений модулюючий вплив дефіциту та

надлишку H_2S в організмі на фармакодинаміку НПЗЗ сприятиме розробці принципів цілеспрямованої регуляції фармакологічної активності та прогнозуванню безпеки фармакотерапії препаратами цієї фармакологічної групи.

Результати проведених досліджень стосовно позитивного впливу донору H_2S на токсикометричні параметри та фармакологічну активність диклофенаку натрію вказують на доцільність розробки та створення вітчизняних H_2S -вивільняючих нестероїдних протизапальних лікарських засобів.

Впровадження результатів дослідження

Результати роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр фармакології (протокол №1 від 28.08.2015 р.), клінічної фармакології та клінічної фармації (протокол №2 від 31.08.2015 р.), біологічної та загальної хімії (протокол №2 від 8.09.2015 р.) Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, кафедри фармакології та клінічної фармакології ДЗ Дніпропетровська державна медична академія (протокол №1 від 31.08.2015 р.), кафедр фармакології Національного медичного університету імені О.І. Богомольця (протокол №3 від 14.09.2015 р.), Національного фармацевтичного університету (протокол №3 від 4.09.2015 р.), ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» (протокол №1 від 27.08.2015 р.), ДВНЗ «Буковинський державний медичний університет МОЗ України» (протокол №1 від 25.08.2015 р.).

Особистий внесок здобувача

Автором особисто проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано дані вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дисертації, обрано методи дослідження. Автором розроблені методичні підходи, апробовано моделі та методи виконання експериментальної

частини дисертаційної роботи. Дисертант особисто виконав експериментальні дослідження, математичну обробку і статистичний аналіз результатів. Дисертантом самостійно написано та оформлено розділи роботи, сформульовано висновки дисертації.

Апробація результатів дослідження

Результати роботи викладені та обговорені на: Всеукраїнській науково-практичній конференції "Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції" (Тернопіль, 2011); IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011); науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю (Київ, 2011); першому Україно-Йорданському конгресі (Вінниця, 2011); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань в світлі доказової медицини» (Вінниця, 2013); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» (Харків, 2013); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014); Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Вінниця, 2015), VIII науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця 9-10 листопада 2015).

Публікації

За матеріалами дисертації надруковано 18 наукових праць, з них - 5 статей у фахових наукових журналах рекомендованих МОН України, в т.ч. 3 статті у зарубіжних періодичних виданнях, 3 патенти України на корисну модель, 1 інформаційний лист про нововведення в систему охорони

здоров'я, 9 тез доповідей вітчизняних та зарубіжних конференцій, конгресів та з'їздів.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В РЕАЛІЗАЦІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ЕФЕКТУ ТА ТОКСИЧНОСТІ НПЗЗ (огляд літератури)

1.1 Нестероїдні протизапальні засоби: фармакодинаміка та механізми дії

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗЗ) представляють собою великий клас лікарських препаратів, різноманітних за своєю хімічною структурою, які об'єднують спільний механізм фармакологічної дії, пов'язаний з пригніченням синтезу прозапальних агентів - простагландинів, лекотрієнів, тощо. НПЗЗ впливають майже на всі ланки патогенезу запалення: виникнення та проведення больового імпульсу, ексудацію, агрегацію елементів крові, неоангіогенез, клітинний апоптоз. Завдяки мультиполярності впливу, численність препаратів цієї групи в світі, сягає близько 104, які представлені 3009-ма торговими марками [44, 45]. Препарати цієї групи активно застосовуються в багатьох галузях медицини: ревматології, терапії, неврології, хірургії, травматології та ін. Завдячуючи такій широті терапевтичного профілю НПЗЗ лишаються багато років поспіль однією з найбільш доступних груп безрецептурних препаратів, поєднуючи в собі високу ефективність, різноманітність форм випуску (покращує зручність використання), відносну недороговизну, розрекламованість, та не потребує спеціальних навиків введення даних ліків. Це пояснює їх розповсюдженість, та неконтрольованість прийому серед пацієнтів всіх вікових груп [46]. За останні 30 років частота прийому препаратів групи НПЗЗ в світі значно зросла, так, за даними літератури, близько 30 млн. людей щодня приймають ці препарати, як з метою боротьби з гострим больовим синдромом, так і у зв'язку з хронічними захворюваннями.

Основні фармакологічні ефекти НПЗЗ представлені в таблиці 1.1.

Основні ефекти нестероїдних протизапальних препаратів та механізми їх реалізації [47]

Основний ефект	Механізм
Протизапальний	НПЗЗ пригнічують здебільшого фазу ексудації, але деякі, найбільш сильні, впливають і на фазу проліферації і як результат пригнічують синтез колагену та формування рубця. За протизапальною дією всі НПЗЗ поступаються гормонопрепаратам, механізм дії яких реалізується через інгібування ферменту фосфоліпази A_2 , який знаходиться на сходінку вище в каскаді арахідонової кислоти.
Знеболюючий	Аналгезуючий ефект є досить сильним, але значно поступається наркотичним анальгетикам, тому застосування НПЗЗ обмежується болями середньої та низької інтенсивності за шкалою болю 5-7 балів. Найбільшим знеболюючим ефектом володіють диклофенак натрію та кетопрофен. На користь НПЗЗ свідчить відсутність у останніх побічних дій, властивих наркотичним анальгетикам: звикання, ейфорія, лікарська залежність, пригнічення дихального центра та дихання, а також відсутність спазмогенного впливу.
Жарознижуючий	Особливістю жарознижуючого ефекту є те, що НПЗЗ здатні знизити температуру тіла при лихоманці, тоді як на нормальну температуру тіла не впливають.
Антиагрегантний	В результаті впливу на ЦОГ-1 в тромбоцитах знижується інтенсивність синтезу ендogenous проагента тромбоксану та знижується здатність тромбоцитів до агрегації незворотно та на всю тривалість життя клітин. Селективні та високоселективні інгібітори ЦОГ-2 навпаки, мають тромбогенну дію.
Імуносупресивний	Імуносупресія має «вторинний» характер і виявляється тільки при довготривалому прийомі та пов'язана з зниженням проникності капілярів, а також НПЗЗ контакт антитіл з субстратом то контакт комплементарних клітин з антигеном.

Загальні покази до застосування НПЗЗ:

Колагенози – ревматизм, ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, хвороба Бехтерева, склеродермія - в таких випадках доволі часто використовують комбінування НПЗЗ з стероїдами; біль запального генезу в м'язах (міозити), суглобах, центральній та периферичній нервовій системі; запальні процеси та біль в органах грудної клітки (легені, бронхи, серце) та в органах малого таза. При болях в органах черевної порожнини НПЗЗ мало ефективні; головний та зубний біль; в якості антиагрегантів (аспірин); При підвищенні температури тіла. В останнє десятиліття активно обговорюють призначення НПЗЗ для зниження ризику раку у пацієнтів з передраковим процесами колоректальної ділянки, як генетично детермінованими, так і такими, що виникли на тлі захворювань цієї ділянки [48]

Наразі прийом НПЗЗ стає соціальною проблемою у зв'язку зі зміною сприйняття больового синдрому людиною, біль сприймається як банальне непорозуміння, та спонукає людину до неконтрольованого прийому знеболюючого засобу. Щороку населення земної кулі вживає більше 40 млрд. таблеток, які містять ацетилсалицилову кислоту, в рік виписується близько 500 млн рецептів на НПЗЗ, а використання НПЗЗ, які придбались без рецептів, приблизно в 7-8 разів перевершує прийом препаратів, які призначались лікарем. Навіть у розвинених країнах світу, де ведеться належний контроль за прийомом ліків, проблема лишається актуальною, наприклад в США щорічно виписується близько 70 млн рецептів на ці препарати, 20 млн пацієнтів приймають НПЗЗ тривалий час, не враховуючи приблизно 26 млрд таблеток на рік, які споживачі купують без рецептів [45, 49, 50]. В Україні НПЗЗ займають провідне місце за обсягами продажу, в аптечній мережі пропонується близько 183 торгових назв препаратів, що з урахуванням різних форм випуску складає близько 290 препаратів, здебільшого імпортного виробництва. [51]. Наразі в Україні найбільший сегмент ринку (більше 50 %) належить препаратам, похідним оцтової кислоти, де лідуючу позицію займає саме диклофенак (47,6 % від всієї номенклатури). Друге місце займає група препаратів пропіонової кислоти - ібупрофен (10,7 %). Близько 15,5 % асортименту НПЗЗ складають препарати

групи оксикамів – піроксикам (13,8 %). Препарати інших 4-х груп НПЗЗ складають близько 5,51 % ринку. Такий об'єм реалізації ліків групи НПЗЗ складає велику небезпеку по відношенню до розвитку побічних дії, та ускладнень. За даними літературних джерел, близько 30 % пацієнтів, які отримують нестероїдні протизапальні мають ускладнення збоку різних органів та систем, тому вирішення проблеми безпечного застосування і знаходження підходів до підвищення безпеки фармакотерапії - є пріоритетним завданням фармакології.

1.2 Гастротоксичність НПЗЗ, механізми розвитку та сучасні підходи до профілактики

В США побічні дії НПЗЗ є причиною 107 тисяч госпіталізацій та 16,5 тис. смертельних випадків кожен рік, що співставляється з смертністю від ВІЛ-інфекцій та лейкемії [52]. Спектр побічних дій НПЗЗ досить широкий, однак, особливе значення мають ускладнення з боку шлунково-кишкового тракту (так звані НПЗЗ-гастро- і ентеропатії)

Термін НПЗЗ-гастропатія (NSAID-gastropathy) запропонований в 1986 році S. H. Roth, вживають для позначення патології шлунка та 12-палої кишки, яка пов'язана з прийомом нестероїдних протизапальних засобів і яка діагностується за умов наявності ушкодження слизової оболонки гастродуоденальної зони з розвитком ерозій та виразок та їх ускладнень (кровотечі, перфорація, порушення прохідності тощо). Згідно МКБ-10, це ускладнення позначається «НПЗЗ-гастропатія: виразка шлунка, ускладнена кровотечею» або інше ерозивно-виразкове ураження гастродуоденальної зони (Y 45.8, K 25, K 92). [15, 50, 53].

В нормальних умовах цілісність слизової оболонки шлунка підтримується певними захисними механізмами. До систем, які забезпечують резистентність слизової ШКТ до дії пошкоджуючих чинників належать передепітеліальні фактори (слизисто-бікарбонатний фосфоліпідний «бар'єр»), епітеліальний «бар'єр» (поверхневі епітеліальні клітини, які щільно зв'язані між собою і

продукують бікарбонати, слиз, фосфоліпіди, простагландини та білки теплового шоку), а також поступателіальний бар'єр, який забезпечується адекватною мікроциркуляцією слизової оболонки, регуляція якої здійснюється простагландинами, оксидом азоту та іншими вазоактивними речовинами [54, 55, 56].

НПЗЗ здатні порушувати всі рівні захисту СОШ. В формуванні НПЗЗ-гастропатії суттєве значення належить порушенню рівноваги між факторами агресії і захисту гастроінтестинальної слизової, при цьому НПЗЗ впливають на всі рівні захисного кишечного бар'єра – передепітеліальний, епітеліальний та поступателіальний [57, 58].

На сьогоднішній час встановлені 7 основних факторів ризику ГПЗЗ-гастропатій (вік старше 65 років, ураження верхніх відділів ШКТ в анамнезі (виразки, кровотечі, перфорації, порушення прохідності), супутня патологія (недостатність кровообігу, печінкова та ниркова недостатність), вживання високий доз НПЗЗ, одночасний прийом декількох НПЗЗ (включаючи низькі дози аспірину), прийом глюкокортикоїдів і антикоагулярнів, інфекція *Helicobacter pylori*. [53, 59].

В якості етіопатогенетичних факторів в розвитку НПЗЗ-гастропатії розглядають наступні: локальне подразнення СОШ і наступне утворення виразки; інгібування синтеза простагландинів (ПГ) (ПГЕ2, ПГІ2) та їх метаболітів простацикліна і тромбосана А2 в СОШ, які виконують функцію цитопротекції; порушення кровоплину в слизовій оболонці на тлі попереднього пошкодження ендотелія судин після прийому НПЗЗ [15, 60].

Топічна пошкоджуюча дія НПЗЗ проявляється тим, що через деякий час після прийому препаратів спостерігається підвищення проникнення іонів водню і натрію в слизову оболонку. НПЗЗ подавляють продукцію прстагландинів не тільки у вогнищах запалення, але і на системному рівні, тому розвиток гастропатії – своєрідний запрограмований фармакологічний ефект цих препаратів [58, 60, 61, 62].

Вважають, що НПЗЗ шляхом впливу на прозапальні цитокіни можуть викликати апоптоз епітеліальних клітин. При застосуванні цих препаратів вражається гідрофобний шар на поверхні СОШ, збіднюється склад

фосфоліпідів і знижується секреція компонентів шлункового слизу. В механізмі ульцерогенної дії НПЗЗ важливу роль відіграє зміни ПОЛ. Продукти, які утворюються в процесі ПОЛ, обумовлюють ураження СОШ і руйнують мукополісахариди. Крім того, НПЗЗ володіють певним впливом на синтез лейкотрієнів, зниження кількості яких приводить до зменшення об'єму слизу, яка має цитопротекторну дію. Зниження синтезу ПГ приводить до зменшення синтезу слизу та бікарбонатів, які є основним захисним бар'єром СОШ від агресивних факторів шлункового соку [63, 64, 65].

Можна виділити такі основні ланки патогенезу НПЗЗ-гастропатій [66]:

- Інгібування ЦОГ-1 і порушення синтезу простагландинів;
- Порушення метаболізму арахідонової кислоти, а саме - перехід на 5-ліпоксигеназний шлях з підвищенням синтезу лейкотрієнів (ЛТВ₄), а також пептидолейкотриєнів — LTC₄, LTD₄ и LTE₄ та розвиток місцевої запальної реакції;
- Посилення нітрозативного та оксидативного стресу;
- Активація продукції прозапальних цитокінів (фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α);
- Активація проапоптотичних генів (*NSAID-activated gene*, *NAG-1*), інших захисних медіаторів (фактори росту, кальцитонін ген-зв'язаний пептид (CGRP), деяких гормоноподібних речовини ШКТ (гастрин, холецистокінін, лептин, грелін, гастрин-вивільняючий пептид (GRP).
- Зменшення продукції інших вазоактивних молекул (наприклад, гідроген сульфіду).

На теперішній час існують численні підходи до профілактики та лікування гастропатій, спровокованих прийомом НПЗЗ, до яких відносять: повна відмова від використання препаратів групи НПЗЗ, або заміна їх на селективні та високоселективні інгібітори ЦОГ-2, застосування H₂-блокаторів, інгібіторів протонної помпи, синтетичних аналогів простагландинів E₁, антихелікобактерна терапія, використання препаратів інших груп с противиразковимим властивостями (табл. 1.2).

Основні підходи до профілактики НПЗЗ-гастропатій

№	Метод профілактики	Переваги	Недоліки	Літературні джерела
1	2	3	4	5
1.	Повна відмова від НПЗЗ	Відмова від стандартних НПЗЗ призводить до зникнення самого етіологічного чинника гастропатії	Повна відмова від НПЗЗ сама по собі не призводить до загострення уражень слизової оболонки шлунка у більшості пацієнтів, та не вирішує питання щодо лікування хворого	67
1.	Заміна стандартних НПЗЗ на селективні або високо селективні інгібітори ЦОГ	Доведене зменшення пошкоджуючого впливу на слизову оболонку шлунка.	Досить суперечливим є питання про доцільність такого методу у зв'язку з недостатньою доказовою базою, та, головне, небезпекою розвитку тромботичних ускладнень у пацієнтів, які отримують селективні інгібітори ЦОГ2	21, 68, 69, 70, 71
2.	Призначення інгібіторів протонної помпи	В дослідженнях ASTRONAUT, OMNIUM, OPPULENT та SCUR було продемонстровано достовірну ефективність омепразола в дозі 20 мг, порівнюючи з гістаміноблокаторами, в профілактиці уражень слизової оболонки шлунка.	Підвищення ризику розвитку кишкових інфекцій (псевдомембранозний коліт); Підвищення ризику негоспітальної пневмонії; Міграція <i>Helicobacter pylori</i> з антрального відділу в тіло шлунка з гіперпластичними та диспластичними процесами; Більш швидкий розвиток постменопаузального остеопорозу, переломів стегна та хребта; Зниження ефективності клопідогреля та підвищення ризику кардіоваскулярних катастроф у хворих з кардіологічною патологією; Підвищення токсичності метотрексату	14, 17, 53, 72

1	2	3	4	5
3.	Призначення Н ₂ гістаміно-блокаторів	Зменшення проявів гастротоксичності 12-палої кишки та загоєння виразок на 8 тижень лікування у 84 % хворих, швидке полегшення проявів больової реакції.	Гастротоксичність НПЗЗ проявляється на рівні шлунка та 12-палої кишки, окрім того не існує жодного твердження про їх перевагу над ІПП, навіть проведені рандомізовані дослідження свідчать про їх недостатню ефективність в порівнянні з ІПП та синтетичними аналогами простагландинів. Крім того, препарати цієї групи володіють власними досить вагомими побічними ефектами.	53, 67, 73, 74
4.	Застосування синтетичних аналогів простагландинів	Виражена гастропротекторна дія	Розвиток важкого діарейного синдрому та інших специфічних побічних дії.	14, 75
5.	Сумісне застосування антацидів	Швидке настання ефекту, зменшення проявів больового синдрому.	При довготривалому використанні існує ризик розвитку остеопорозу та хронічного отруєння свинцем і алюмінієм.	76
6.	Гастропротекція за допомогою сукральфату	Доведена ефективність даного препарату при сумісному застосуванні з НПЗЗ в рандомізованих дослідженнях	Немає жодних даних про їх перевагу над препаратами ІПП та гістаміноблокаторів. Крім того, існують власні побічні дії.	77

Однак, проблему профілактики та лікування НПЗЗ-гастропатій на сьогоднішній день не можна вважати остаточно вирішеною, зважаючи на високу захворюваність і смертність, асоційовану з цим класом лікарських засобів [4, 25, 26, 27, 78]. Вищезазначене свідчить, що проблема ефективного та безпечного застосування НПЗЗ ще далека від свого остаточного вирішення. Це

зумовлює необхідність більш досконалого вивчення всіх факторів, які можуть змінювати пошкоджуючий вплив препаратів цієї групи на організм людини, в тому числі і на шлунок. Серед таких факторів увагу науковців привернув гідроген сульфід (H_2S).

1.3 Участь гідроген сульфіду в фізіології та патології організму

Гідроген сульфід (H_2S) був вперше синтезований в 1777 році шведським хіміком Карлом Вільгельмом Шееле, і з того часу ця молекула набула неабиякої значимості. Як було відомо донедавна, гідроген сульфід представляє собою легкозаймистий та безбарвний газ з різким запахом «тухлих яєць», та протягом десятиліть вважався токсичним газом, досить розповсюдженим в навколишньому середовищі (вулканічних газах, тощо). В природі, цей газ синтезується при розпаді білків, які в свою чергу містять сірковмісні амінокислоти, які також містяться в незначній кількості в кишківнику тварин та людини. В нормі його концентрація не повинна перевищувати $0,1 \text{ мг/м}^3$, а відтак, H_2S залишається найнебезпечнішим (в 5 разів більш токсичний ніж CO), через свою спроможність інгібувати процеси тканинного дихання, пригнічуючи цитохром-с-оксидазу [79]. Нещодавно стало відомо, що цей газ синтезується в організмі людини і тварин, та інтенсивність синтезу, а, отже, і вміст, і біологічний ефект в різних клітинах організму – відрізняється. З кінця 90-х років XX століття інтерес до H_2S значно посилюється у зв'язку з встановленням його причетності до регуляції фізіологічних функцій у тварин та людини [81]. Сьогодні H_2S є визнаним членом родини газотрансмітерів, яка включає нітроген монооксид (NO) та карбон монооксид (CO) і бере участь в регуляції судинного тону, нейромодуляції, цитопротекції, запаленні, апоптозі та інших процесах [34, 80, 82, 83, 84].

H_2S є короткоживучою молекулою з періодом напівжиття у кілька хвилин [82]. У водних розчинах при pH 7,4 20-30 % H_2S існує в недисоційованій формі та 70-80 % - у вигляді гідрогенсульфід-аніону ($\text{H}_2\text{S} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HS}^-$; $\text{pK}_a=6,89$), який частково перетворюється в сульфід-аніон (S^{2-}) [34, 85]. H_2S має високу

ліпофільність і вдвічі легше розчиняється в ліпідних мембранах (коефіцієнт розподілу - 2,06), ніж у воді [85].

Основними субстратами для ендogenous H_2S в тканинах є сірковмісні амінокислоти – L-цистеїн та L-гомоцистеїн, основними ферментами-продуцентами його є піридоксальфосфатзалежні ензими цистатіонін- β -синтаза (ЦБС, КФ 4.2.1.22), цистатіонін- γ -ліаза (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1), а також цистеїнамінотрансфераза (ЦАТ, КФ 2.6.1.3). До основних реакцій, які забезпечують утворення H_2S в тканинах тварин та людини, відносять: 1) десульфурування L-цистеїну до пірувату за участі ЦГЛ; 2) конденсації L-гомоцистеїну з L-цистеїном та десульфурування L-цистеїну до L-серину за участі ЦБС; 3) трансамінування L-цистеїну з α -кетоглутаратом за участі ЦАТ з утворенням 3-меркаптопірувату, з якого далі вивільняється H_2S за участі 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3-МСТ, КФ 2.8.1.2) [86, 87].

В організмі H_2S виконує роль сигнальної молекули, газотрансміттера, специфічних рецепторів для якого не знайдено. Молекулярними мішенями H_2S виступають різні іонні канали, рецептори, ензими та протеїни, які регулюють широке коло біохімічних та фізіологічних процесів.

Вміст H_2S в плазмі крові тварин (щурі) та людини становить біля 50-80 мкМ [34, 82, 88], тоді як в тканинах H_2S міститься в більш значних кількостях, і його концентрація в різних органах досить сильно варіює. З порушеннями вмісту та продукції H_2S в тканинах асоціюються різні **патологічні стани**. Зниження базального вмісту H_2S в плазмі крові відмічається у хворих з артеріальною гіпертензією, ішемічною хворобою серця, тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок, хворобою Альцгеймера, гіпергомоцистеїнемією [34, 88, 89]. Наприклад, у хворих з ІХС рівень H_2S знижується з 50 мКмоль/л до 25 мКмоль/л, також при моделюванні спонтанної гіпертензії у щурів лінії Вістар рівень H_2S знижувався з 48 до 20 мКмоль/л [90, 91]. На противагу цьому, в багатьох випадках, рівень гідроген сульфід збільшується, наприклад, при цукровому діабеті та при шоківих станах, в експерименті на мишах відмічено різке зростання рівня гідроген сульфід продукуючих ензимів (на 40 %) в гомогенатах лапок при попередньому введенні карагеніну [92]. Також,

підвищення рівня цього трансмітера відмічено при моделюванні гострого панкреатиту у мишей в межах (з 23 до 31 мКмоль/л), при геморагічному шоці вміст гідроген сульфід в плазмі збільшився (з 30 до 40), в гомогенатах печінки та нирок при дослідженні вмісту ензимів продуцентів сульфідів, останні збільшились на 60 %. Така ж тенденція зберігається при спробі моделювання ендотоксичного шоку, при перев'язці та проколі сліпої кишки в умовах відтворення перитоніту [40].

Існує дуже мало досліджень, які свідчать про здатність інгібіторів синтезу гідроген сульфідів, на моделях місцевого запалення, викликаного карагеніном, зменшувати прояви запалення а саме набряку [92], в той час, як при моделюванні запального процесу за допомогою церулеїна (модель системного запалення), свідчить, що гідроген сульфід виявив здатність до зміни експресії різних генів та зменшення продукції прозапальних цитокінів, та активації антиоксидантних систем, в наслідок видалення пероксидів, та продуктів перекисного окислення, чим і зменшує прояви системної запальної реакції. Напротивагу цьому, додаткове введення пропаргілгліцину зменшувало некроз підшлункової залози при панкреатиті [40]. У щурів хронічне введення пропаргілгліцину призводило до збільшення некротичного осередку при моделюванні гострого інфаркту міокарду [93, 94, 95]. Додаткове введення гідроген сульфідів в дослідках при відтворенні різноманітних патологічних процесів показало його спроможність зменшувати прояви гіпоксії тканин при ішемічному інсульті [96], цей же ефект може бути використаний при трансплантації органів [97].

Не менш цікавим є здатність гідроген сульфідів модулювати відповідь організму на запалення, а саме, на набряк та біль. При цьому кількість ендogenous гідроген сульфідів в осередку запалення при моделюванні карагенінового набряку зростає, однак додаткове введення донорів гідроген сульфідів, має протизапальну дію, зменшуючи набряк, біль та інфільтрацію нейтрофілів в осередку запалення [40, 93, 98]. Ще один ефект, який достеменно описаний вченими, це здатність гідроген сульфідів стимулювати ангіогенез, викликаючи проліферацію клітин ендотелію [99]. Також, дослідження свідчать

про значний вплив гідроген сульфїду на ноціцепцію, цей вплив опосередковується через вплив на експресію білка раннього реагування, так званого fos в мотонейронах задніх рогів спинного мозку, крім того впливом на продукцію NO шляхом взаємодії з K^+ -каналами [100].

В літературі існує чимало підтверджень модулюючого впливу вмісту гідроген сульфїду на перебіг патологічних процесів (табл.1.3).

Таблиця 1.3

Вплив донорів та інгібіторів синтезу гідроген сульфїду на перебіг патологічних процесів

Експериментальна модель	Модулятор рівня H_2S	Біологічний ефект
1	2	3
Донор H_2S		
Легенева гіпоксія, викликана вазоконстрикцією	NaHS (0,8 мг/кг)	Зниження ступеня вазоконстрикції, збільшення стійкості до гіпоксії [101]
НПЗЗ-індуковані гастропатії	NaHS 1,6-8 мг/кг	Захист від пошкоджень слизової оболонки шлунка (знижує експресію ЦОГ-2 c-fos, та інфільтрацію нейтрофілів) [102]
Моделювання ішемії міокарду з реперфузією	NaHS 3 мг/кг	При попередньому введенні зменшення розмірів інфаркту [94, 102, 103, 104, 105, 106, 107].
Аспірин індукована адгезія лейкоцитів	NaHS 0,6-6,0мг/кг	Зменшення адгезії лейкоцитів, покращення загоєння [98].
Карагенін-індукований набряк задньої лапи	NaHS 8,0 мг/кг	Зменшення набряку [83, 98].
Ендотоксин-індуковане запалення	H_2S -вивільняючий диклофенак	Зменшення інфільтрації нейтрофілів, кількості IL1 β , збільшення кількості IL10, пригнічення експресія NOS, COX 2 [108].
Модель летальної кровотечі	H_2S 300 ppm	Підвищення виживаємості [109].
Ішемічний інсульт	NaHS малі дози	Зменшення проявів гіпоксії тканин [96]
Інгібітор продукції H_2S		
Геморагічний шок у мишей	PAG або ВСА (50 мг/кг)	Розвиток вазопресорного ефекту [110].
Гострий церулеїн індукований панкреатит	PAG (50 мг/кг)	Зменшення рівня циркулюючої амілази, зменшення рівня мієлопероксидази [40].

1	2	3
Запалення, індуковане ендотоксинами у мишей	PAG (50 мг/кг в/оч)	Зменшення кількості мієлопероксидази в гомогенатах нирок та печінки [111].
Зміни гемодинаміки при ендотоксин індукованому запаленні	PAG (50 мг/кг)	Зменшення рівня мієлопероксидази та маркерів альтерації АЛТ, АСТ [112].
НПЗЗ індуковані гастропатії у щурів	BCA (50 мг/кг)	Збільшення важкості виразкування, адгезії нейтрофілів Збільшення медіаторів запалення TNF, COX-II. [102].
Карагеніновий набряк у щурів	PAG (50 мг/кг)	Зменшення набряку та рівня мієлопероксидази в гомогенаті [92].
Карагеніновий набряк у щурів	BCA (50 мг/кг в/оч)	Збільшення набряку [98].
Сепсис індукований проколом сліпої кишки	PAG (50 мг/кг)	Зниження смертності тварин, та покращення гістологічної картини органів [113].
Інфаркт міокарду у щурів індукований перев'язкою коронарної артерії.	PAG (50 мг/кг)	При введенні протягом семи днів зростання зони некрозу [93, 94].
Інфільтрація мононуклеарів при запаленні після введення карагеніну	BCA (50 мг/кг в/оч)	Збільшення проникності мононуклеарних клітин [98].
Аспірин індукована адгезія лейкоцитів в мезентеріальних венулах у щурів	BCA (50 мг/кг в/оч)	Збільшення адгезію мононуклеарних клітин в мезентеріальних венулах [98].
Моделювання оклюзії середньої церебральної артерії	PAG або BCA (50 мг/кг)	Зниження ударного об'єму крові [96].

Примітки: PAG – пропаргілгліцин; BCA - β-ціано-аланін

Таким чином, як видно з даної таблиці гідроген сульфід, а також молекули донори, мають позитивний вплив на деякі нозологічні стани, відтворенні в експерименті, та на різноманітні механізми цих ефектів, від зміни метаболізму в клітинні, до прямої судинорозширювальної дії, активації K^{+} -

каналів, регуляції експресії генів, які відповідають за синтез циклооксигенази 2, fos, IL-1 β , а також має невеликий інгібуючий вплив на агрегацію тромбоцитів. В деяких випадках додаткове введення донорів гідроген сульфідіду сприяло загостренню патології, наприклад, при моделюванні гострого порушення мозкового кровообігу та генералізованого сепсису. Цікавим, на думку багатьох вчених є і той факт, що інгібування, та додаткове введення гідроген сульфідіду здатні зменшувати прояви запалення у щурів, наприклад, на моделі карагенінового набряку [92, 93, 98].

Лікування препаратами які впливають на рівень гідроген сульфідіду зводиться до двох основних напрямків: це застосування донора гідроген сульфідіду та інгібіторами ендogenous синтезу та ферментів продуцентів ЦГЛ та ЦБС. В ґрунтовному огляді, який описує сучасні уявлення про біологічну роль та механізми впливу гідроген сульфідіду на організм, Н. В. Заїчко та співавт. [43] запропонували класифікацію модуляторів обміну H₂S, які застосовуються в біології та медицині (табл. 1.4.):

Таблиця 1.4

Класифікація модуляторів обміну H₂S, які застосовуються в біології та медицині [43]

Група		Представники
1		2
1. Засоби, що підвищують вміст H₂S в тканинах		
1.1	Донори H ₂ S	Неорганічні - NaHS, Na ₂ S; органічні - реактив Lawesson
1.2	Субстрати H ₂ S-синтезуючих ензимів та їх деривати	L-цистеїн, D-цистеїн, N-ацетилцистеїн, S-алілцистеїн, S-пропаргілцистеїн, S-пропілцистеїн, тіосульфат натрію
1.3	Засоби з ефектом вивільнення H ₂ S (H ₂ S-releasing drugs)	H ₂ S-деривати нестероїдних протизапальних засобів (S-аспірин, S-диклофенак, S-напроксен), L-ДОФА (ACS ₈₃₋₈₆), сілденафіл (ACS6)
1.4	Засоби, що містять кофактори та активатори H ₂ S-синтезуючих ензимів	Вітамінно-мікроелементні та полімікроелементні комплекси (ВМК, есмін)
1.5	Засоби, які інгібують утилізацію H ₂ S	аторвастатин

1		2
2. Засоби, що знижують вміст H_2S в тканинах		
2.1	Специфічні інгібітори H_2S -синтезуючих ензимів	пропаргілгліцин, β -ціаноаланін, β -амінооксиацетат, гідроксиламін
2.2	Неспецифічні інгібітори H_2S -синтезуючих ензимів	нестероїдні протизапальні засоби (диклофенак, кетопрофен, індометацин, аспірин), цисплатин
3. Засоби з невизначеним механізмом впливу на обмін H_2S		
3.1	Підвищують вміст H_2S в тканинах	карведілол, дігосин, раміприл, парацетамол (в печінці, нирках), метформін
3.2	Зменшують вміст H_2S в тканинах	парацетамол (в мозку), амлодипін

Наразі залишається питання про обґрунтованість синтезу та подальшого використання засобів які здатні вивільняти гідроген сульфід.

1.4 Роль гідроген сульфіду в фізіології та патології шлунково-кишкового тракту

Незважаючи на досить велику кількість даних літератури щодо участі цієї молекули в фізіологічних та патофізіологічних процесах, роль його в функціонуванні шлунково-кишкового тракту вивчена не настільки ретельно, хоча в останні роки з'явилися дані щодо здатності ендогенно синтезованого у ШКТ гідроген сульфіду регулювати секреторну та моторну функцію, чинити про- та протизапальну, анти- та ноцицептивну дії [114, 115, 116, 117, 118, 119].

H_2S продукується в ШКТ як ензиматичним, так і неензиматичним шляхом в клітинах ссавців, однак, переважний шлях є ензиматичний. В синтезі гідроген сульфіду в ШКТ приймають участь два головних піридоксальфосфат-залежних цитозольних ензими – ЦБС та ЦГЛ. Згідно даних літератури, в шлунку щурів мишей ці ферменти експресуються в гладком'язевих клітинах антральних відділів [114, 120], в тонкому кишечнику [121, 122, 123, 124, 125, 126]. В 12-палій та тонкий кишці щурів обидва ферменти експресуються в нейронах

мезентеріальних нервових вузлів [123, 125,]. Експресія ЦБС і ЦГЛ також була знайдена в клубовій кишці щурів та гвінейських свиней, де продукція H_2S складає 6,61 нМ/хв/г тканини та 20,33 нМ/хв/г протеїну, відповідно [121, 124]. ЦГЛ також експресується в субмукозних та мезентеріальних нейронах товстої кишки [127, 128, 129, 130], а також в циркулярних та повздожних м'язах кишечника щурів [130]. Крім того, ЦБС експресується в кишечника, а також в слизовій оболонці товстої кишки [127, 129, 130].

Відомо також, що окрім ендогенної продукції, гідроген сульфід може продукуватись екзогенним шляхом, а саме кишковою мікробіотою, зокрема, сульфат-редуючими бактеріями (SRB) [118]. У фізіологічних умовах, рівень H_2S в кишечнику не є дуже високим завдяки високій здатності епітеліальних клітин кишечника метаболізувати H_2S [131]. Однак, в разі якщо цілісність епітеліального бар'єру порушена, в кишечнику можуть створюватись досить високі концентрації H_2S , що при деяких захворюваннях кишечника может приводити до розвитку токсичних ефектів гідроген сульфиду.

Роль гідроген сульфиду в регуляції секреції шлунка. В роботі Mard S.A. et al., 2014 [133] було показано, що фармакологічне інгібування ЦГЛ введенням пропаргілгліцину приводило до підвищення шлункової секреції у відповідь на розтягнення шлунка та одночасним збільшенням експресії mRNA α -субодиниці H^+/K^+ -АТРази у щурів в порівнянні з контролем. Ці результати підтверджують «хазяйську» (housekeeping) роль H_2S , яка полягає в підтримці цілісності слизової шлунку шляхом стимуляції секреції бікарбонатів [134, 135] водночас зменшенням виділення соляної кислоти. Більше того, показано, що ендогенний H_2S симулює скоротливість гладкої мускулатури шлунка у мишей та морських свиней [136, 137].

Ще одним механізмом, який пояснює антисекреторну функцію гідроген сульфиду, є його синергістичні взаємовідносини із нітроген монооксидом. Так, Ise та співав. показали, що в/шл введення NaHS (донору H_2S), підвищувало вивільнення NO в 12-палій кишці щурів [135]. Інгібіторний ефект NO на шлункову секрецію опосередковується через безпосередній вплив на парієтальні клітини або непрямим шляхом через пригнічення вивільнення

гістаміну [138, 139 140]. Водночас антисекреторний ефект H_2S значно зменшувався після попереднього введення L-NAME (інгібітора NOS) та ППГ (інгібітора ЦГЛ). Тобто, інгібіторний ефект H_2S на гастральну секрецію може частково опосередковуватись через підвищення виділення NO. Інгібіторний ефект гідроген сульфїду на гастральну секрецію частково опосередковується через підвищення експресію гену eNOS та одночасного підвищення продукції/або вивільнення NO, що і веде до антисекреторного ефекту [133].

Ще одним фактором, який лежить в основі механізму інгібіторного або нейтралізуючого ефекту H_2S на секрецію шлунку, є його вплив на експресію гену ЦОГ-2. Як відомо, гідроген сульфїд підвищує експресію гену ЦОГ-2 та продукцію PGE_2 в ізольованих кардіоміоцитах [141], а також в товстому кишечнику щурів [142]. Враховуючи антисекреторні та антацидні властивості простагландинів, можна думати, що редукція синтезу гідрохлоридної кислоти та зниження кислотності шлунку, яке викликав NaHS, частково пов'язана із підвищенням продукції простагландинів.

В дослідженні [133] показано, що в/в введення NaHS та 5-денне введення L-цистеїну суттєво зменшує експресію mRNA α -subunit H^+/K^+ -АТРази у щурів, порівняно з тваринами контрольної групи. Таким чином, можна вважати, що ще одним можливим механізмом антисекреторної дії NaHS на шлункову секрецію, може бути зниження експресії mRNA α -субодиниці H^+/K^+ -АТРази шлунку.

Тобто, підсумовуючи вищезазначене, можна стверджувати, що H_2S проявляє як антисекретоний ефект через зниження виділення соляної кислоти [133] і одночасно, має антацидну активність, збільшуючи продукцію бікарбонатів [135].

H_2S і моторика ШКТ. Ендогенний H_2S відіграє важливу роль в регуляції гастроінтестинальних функцій як за фізіологічних, так і патофізіологічних станів. Численні результати досліджень впливу гідроген сульфїду на моторику ШКТ описують різновекторну дозо-залежну роль гідроген сульфїду в різних частинах кишечника. Ця властивість співставляється з впливом гідроген сульфїду на тонус гладкої мускулатури судин. Так, незважаючи на те, що в цілому H_2S розслабляє гладку мускулатуру судин [143, 144, 145], існують дані

про те, що інгібіторний ефект гідроген сульфїду реалїзується лише у високих концентраціях, тоді як низькі концентрації гідроген сульфїду – навпаки, підвищують скоротливість попередньо скорочених гладком'язових фрагментів судин [144, 145].

В ряді досліджень було показано, що ендогенний гідроген сульфїд виявляв дуальний ефект на спонтанні скорочення гладкої мускулатури в антральній частині, а саме – низькі концентрації H_2S підвищували базальний тонус, тоді як високі концентрації – навпаки, пригнічували спонтанну скоротливість [114, 120, 136]. Подібний ефект $NaHS$ описаний також і в шлунку мурчаків. На додаток до цього, $NaHS$ в низьких концентраціях (<200 М) викликав деполяризацію мембранного потенціалу, хоча на тлі дії інгібітора ЦБС спостерігалась гіперполяризація мембранного потенціалу та зменшення амплітуди повільних хвиль [120].

Було також показано, вплив гідроген сульфїду на скоротливість гладком'язових клітин асоціюється з нітроген монооксидом (NO). Деякі автори [146] стверджують, що виявлений стимулюючий ефект H_2S інгібується в присутності інгібітора вольтаж-залежних калієвих каналів, таким чином ендогенний H_2S прямо інгібує вольтаж-залежний вихід калію. З іншого боку, інгібіторний ефект H_2S зменшується в присутності глібенкламїду - інгібітора K_{ATP} каналів, і ендогенний H_2S прямо підвищує пропускну здатність K_{ATP} каналів в гладкій мускулатурі судин, як це описано в деяких дослідженнях [143, 145]. Всі ці результати свідчать, що збуджуючий ефект гідроген сульфїду в низьких концентраціях опосередковується шляхом інгібування вольтаж-залежних калієвих каналів, тоді як інгібіторний ефект – через активацію K_{ATP} каналів [114, 137]. Medeiros J. V. та співавторами було описано спроможність донору H_2S прискорювати звільнення вмісту шлунку у мишей в дозо-залежний спосіб, що може бути наслідком релаксуючої дії H_2S на мускулатуру пілоричного сфінктера, тоді як у присутності глібенкламїду, антагонїсту ванїлоїдних (TRPV1) рецепторів капсазепїну ця дія нівелювалась, що свідчить про залучення K_{ATP} каналів та TRPV1 рецепторів, розташованих на аферентних нервах, до цього ефекту [147].

Узагальнюючи вищезазначене, вплив H_2S на моторну функцію шлунку адаптований до фізіологічної ролі його різних відділів. Так, на рівні дна шлунка, де відбувається накопичення їжі, гідроген сульфід виконує релаксуючу дію на гладкі м'язи, тоді як стимулюючий вплив H_2S на антральний відділ разом із його інгібіторним ефектом на пілоричний сфінктер, полегшує спорожнення шлунка. Таким чином, H_2S є важливим модулятором роботи шлунка.

Дія H_2S на інтестинальну моторику має видову специфічність та різниться в залежності від ділянки кишечника. У 12-палій кишці щурів лінії Вістар, $NaHS$ індукує двофазну дію на спонтанно скорочену мускулатуру, коли короткочасний збуджуючий ефект змінюється тривалою релаксацією [123]. Така збуджуюча дія може бути наслідком активації ванілоїдних рецепторів в аферентних нервів внаслідок вивільнення субстанції P і подальшої активації галадком'язевих клітин та скоротливості гладкої мускулатури. В той же час, інгібіторний ефект $NaHS$ виникає внаслідок відкриття K_{ATP} каналів гладком'язевих клітин. Аналогічні ефекти гідроген сульфіді були описані і щодо повздовжних м'язів порожньої, клубової та товстої кишки щурів лінії Вістар [123]. На відміну від них, у щурів лінії Левіс і мишей, $NaHS$ виявляв пригнічу дію на скоротливість гладкої мускулатури [148]. Хоча остаточно механізми $NaHS$ -індукованого пригнічення лишаються невідомими, це можливо повзано із різницею в регуляції скоротливості циркулярних та повздовжніх м'язів, що вказує на складну функцію H_2S в модуляції перистальтики порожньої кишки.

В клубовій кишці більшість досліджень показують інгібуючий вплив H_2S на рухову функцію гладкої мускулатури гвінейських свиней, кролів та мишей [128, 129, 130, 150]. Механізми цього впливу наразі ще дискутуються, однак вважається, що це не є наслідком відкриття K_{ATP} каналів [151, 152, 153], а очевидно, пов'язано із впливом гідроген сульфіді на Ca^{2+} -активовані K^+ (SK_{Ca}) канали [152].

Крім кишкових нейронів і клітин гладкої мускулатури, об'єктом H_2S -асоційованої регуляції моторики ШКТ можуть бути пейсмейкерні клітини, інтерстиціальних клітин Кахалю (ICC). Незважаючи на відсутність даних щодо експресії ЦБС та ЦГЛ в цих клітинах, було показано, що екзогенний H_2S

спроможний інгібувати пейсмейкерну активність [126], що може частково пояснити інгібуючий вплив H_2S на моторику тонкого кишечника.

Як було показано, в товстій кишці мишей NaHS дозозалежно інгібував функцію спонтанних та передскорочених гладких м'язів, що не є наслідком впливу на нервову регуляцію [127, 154], а також не пов'язано із впливом на цей ефект K_{ATP} каналів та вмісту NO [154]. У щурів та людей в товстій кишці NaHS також інгібував моторну функцію [149, 155, 156]. Цей ефект суттєво зменшується в присутності блокаторів K_{ATP} каналів та кальцій-активованих калієвих каналів низької провідності (SK_{Ca}), що підтверджує причетність каналів саме цього типу до реалізації ефектів гідроген сульфідіду [153, 155, 156]. Крім того, на відміну від тонкого кишечника, NaHS не змінював частоту повільних хвиль, що відкидає провідну роль ICC в дії H_2S в товстій кишці [155].

Механізми H_2S сигналіngu в регуляції моторики ШКТ. В цілому, аналіз численних даних літератури свідчить, що дія гідроген сульфідіду в ШКТ є досить складною та різноманітною (табл. 3). Так, вектор впливу може різнитись в залежності від ділянки ШКТ, біологічного виду та ін. Узагальнений механізм H_2S -асоційованої регуляції гастроінтестинальної моторики включає:

H_2S впливає на кишечні нейрони. При цьому він активує TRPV1 канали в первинних аферентних нейронах і стимулює вивільнення нейротрансмітера [123, 157], або H_2S активує холінергічну нервово-м'язеву трансмісію [151, 155], що також регулює скоротливість мускулатури ШКТ.

H_2S має прямий вплив на канали в гладком'язевих клітинах, такі як K_{ATP} канали [136, 147, 149, 152, 155], вольтаж-залежні K^+ канали [120, 136], а також SK_{Ca} канали [149, 152, 155]. Однак, слід відмітити, що механізми взаємодії гідроген сульфідіду з цими каналами залишаються до кінця не з'ясованими. Нещодавно було встановлено, що гідроген сульфід має пряму регулюючу дію на фізіологічні функції шляхом сульфгідрування великої кількості клітинних протеїнів [41], наприклад, здатність NaHS сульфгідрувати 2B субодиницю рецептора сульфонілсечовини (SUR2B) в K_{ATP} каналі, може частково пояснити ефект H_2S на ці канали.

1. H_2S також може здійснювати пейсмейкерну активність на інтестинальні клітини Кахала (ICC), і таким чином модулювати скорочувальну функцію гладком'язових клітин [126].

2. Як одна з двох газових молекул, H_2S та NO , взаємодіють між собою в регуляції моторики ШКТ. При цьому їх дія може бути односпрямованою щодо релаксуючого ефекту на м'язи [151], проте за іншими даними, ці дві молекули можуть діяти різноспрямовано [120]. І хоча остаточні механізми потребують подальших досліджень, доведеним є факт інгібуючого впливу ендогенного H_2S на продукцію NO [128].

Таблиця 1.5

Вплив H_2S на моторику ШКТ та його механізми [146].

	Частина ШКТ	Ефект H_2S на моторику	Механізм
Шлунок	Дно	Інгібуючий ефект	Невідомий
	Антральна частина	Стимулюючий ефект	K_v на гладкі м'язи (-)
		Інгібуючий ефект	K_{ATP} на гладкі м'язи (+)
Тонкий кишечник	12-пала кишка	Стимулюючий ефект	TRPV1 на кишечні нерви (+)
		Інгібуючий ефект	K_{ATP} на гладку мускулатуру (+)
	Порожня кишка (jejunum)	Інгібуючий ефект	Невідомий
	Клубова кишка (ileum)	Інгібуючий ефект	K_{ATP} на гладку мускулатуру і на кишечні нерви (+), або
			SK_{Ca} на гладку мускулатуру (+)
Товстий кишечник	Товстий кишечник	Інгібуючий ефект	K_{ATP} (+) або SK_{Ca} (+)

(-) – інгібування; (+) - активація

Гідроген сульфід як стимулятор регенерації в ШКТ. Виразкові ураження шлунку, особливо індуковані НПЗЗ, є досить великою клінічною проблемою, незважаючи на впровадження в клінічну практику селективних інгібіторів ЦОГ-2. Застосування антисекреторних засобів зменшують ризик

утворення виразок та стимулюють їх загоєння, проблема гастроінтестинальних кровотеч залишається невирішеною.

Ендогенних сполук, які можуть стимулювати загоєння виразок шлунку описано досить багато. Сюди відносять простагландини (PG), епідермальний фактор росту фактор росту фібробластів, а також нітроген моноксид [158, 159, 160, 161, 162]. Нещодавно до цього списку увійшли інші газові медіатори. Гідроген сульфід є вазодилататором і нейромодулятором [180], а також підвищує стійкість слизової шлунку до пошкоджуючих факторів [163, 164]. НПЗЗ пригнічують синтез гідроген сульфиду, а призначення донору його зменшує важкість НПЗЗ-індукованих уражень шлунку у щурів [82]. Крім того, H_2S -вивільняючі НПЗЗ виявляють значно меншу здатність до виразкоутворення, незважаючи на їх пригнічувальний вплив на синтез шлункових простагландинів [164]. На додачу до підвищення стійкості СОШ до пошкоджень, H_2S співставляється з оксидом азоту у здатності інгібувати адгезію лейкоцитів до ендотелію судин [98, 163], а також в спроможності проявляти анальгезуючу дію [154, 165].

Дані літератури свідчать [166], що гідроген сульфід, подібно до нітроген монооксиду, володіє здатністю посилювати репаративні процеси в слизовій шлунку, а введення донорів гідроген сульфиду скорочує терміни загоєння виразок та ран. Також було показано, що ранозагоювальна дія гідроген сульфиду щодо виразок шлунка є наслідком його вазорелаксуючого ефекту, та не пов'язана з K^+_{ATP} -каналами та NO-залежними механізмами.

Були проведені дослідження можливих механізмів прискорення загоєння виразок під впливом H_2S . Було встановлено, що на відміну від інгібіторів протонної помпи, які також мають репаративну дію в шлунку та 12-палій кишці [167], жоден із введених донорів гідроген сульфиду в ранозагоювальних дозах, не впливали на об'єм або pH шлункового соку.

Наступним кроком було дослідження ролі ще одного механізму дії гідроген сульфиду – впливу на K^+_{ATP} канали, у репаративній дії щодо СОШ. Як відомо, саме через цей механізм реалізується багато ефектів H_2S , у тому числі розширення кровоносних судин, інгібування адгезії лейкоцитів, вісцеральної

аналгезії, а також антифлогогенна дія, оскільки всі ці ефекти інгібувались при введенні антагоністу K^+_{ATP} каналів (глібенкламід), та посилювались на тлі його агоністу (пінациділу) [154, 168, 169,]. Однак цей механізм, як свідчать результати досліджень Wallace та співавт. [166], також не залучений до реалізації репаративного ефекту H_2S .

Стимулюючий вплив на експресію та вихід нітроген монооксиду з ендогелію судин, який властивий гідроген сульфід, є одним із складових його міо- та вазорелаксуючої дії [122, 169]. З іншого боку, NO може регулювати синтез H_2S [169] частково завдяки підвищенню експресії та активності ЦГЛ [170].

За даними літератури [96, 171], речовини, що містять сульфгідрильні групи, можуть виявляти гастропротективні, але механізм цієї дії залишається неясним. Одним з можливих механізмів, є антиоксидантна дія, яка опосередковується через вплив на рівень глутатіону в шлунку [172]. Підвищений кровотік на периферії виразки, як було показано, має важливе значення для процесів регенерації [174]. Враховуючи, що H_2S є вазодилатор, цілком можливо, що це може бути одним з механізмів, за допомогою яких H_2S сприяє загоєнню. S. Fiorucci та співат. [163] зазначити, що H_2S донори посилюється кровотік в шлунку. Інші ендogenous речовини, які, як було показано для прискорення загоєння виразки, такі як простагландин E_2 та оксиду азоту, як вважають, зробити це в рамках збільшення кровотоку у краю виразки [173]. Потенційні вклади судинних дій H_2S до його сприятливий вплив на загоєння виразки потребують подальшого вивчення.

H_2S був відомий протягом багатьох років, як модулятор метаболічних функцій в клітинах. Так, було показано, що вдихання H_2S може викликати стан гібернації у мишей [173]. Крім того, виявлено, що гідроген сульфід є субстратом для мітохондріального дихання [175]. Тобто, отриманий сприятливий ефект на загоєння виразок, притаманний H_2S , може бути результатом його модулюючого метаболотропного впливу. Отримані докази, що H_2S є ендogenous регулятором загоєння ран, і застосування донорів H_2S може значно прискорювати процес репарації. Тобто, підвищення ендogenous

синтезу або створення відповідних концентрацій H_2S може набути клінічного значення для підвищення загоєння ран, у тому числі виразок шлунково-кишкового тракту.

На основі аналізу літературних даних, можна вважати, що гідроген сульфід - молекула, яка продукується в ШКТ, відіграє важливу роль в регуляції секреторної та моторно-евакуаторної функції, стимулює репаративні властивості травного тракту.

В літературі зустрічаються результати досліджень, в яких показано, що похідний диклофенаку, який вивільнював H_2S , в дослідях на щурах виявляв значно менші пошкоджуючі властивості щодо слизової оболонки шлунку [166]. В окремих експериментальних дослідженнях описані гастропротективний ефект гідроген сульфиду при застосуванні разом з аспірином та диклофенаком, а також його здатність прискорювати загоєння експериментальних виразок шлунку [98, 166], а також продемонстровані експериментальні дані про здатність NO- та H_2S -вивільнюючої молекули суліндаку, поряд з високим профілем безпеки щодо шлунку, виявляти протизапальну, анагезуючу, антипіретичну, антиагрегантну активність та здатність зменшувати ріст широкого кола ракових клітин людини [176].

Незважаючи на наявні дані щодо захисної дії H_2S на шлунок, в літературі практично немає робіт, в яких проводиться комплексний аналіз залежності різного рівня гідроген сульфиду в організмі на прояви небажаних ефектів НПЗЗ, а також кореляція гастропротективної дії гідроген сульфиду із його модулюючими впливами на фармакологічні ефекти цього класу лікарських засобів, в тому числі і за умов патологічних станів. Невизначеними є також і дозові режими, тривалість та способи введення донорів гідроген сульфиду, а також співставлення його гастропротекторних та токсичних доз. До кінця невідомими залишаються біохімічні та молекулярні механізми захисних впливів H_2S на шлунок та інші органи як у тварин, так і у людей.

Таким чином, аналіз даних літератури переконливо свідчить про доцільність подальших поглиблених досліджень впливу дефіциту та надлишку гідроген сульфиду на патологічні процеси в шлунково-кишковому тракті, може

бути ефективним підходом до зменшення гастротоксичності, в тому числі НПЗЗ.

МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дизайн дослідження

Досліди проведені на 341 білому щурі чоловічої статі, масою 180-250 г і 127 білих мишах обох статей, масою 20-25 г, які утримувались в умовах віварію ВНМУ ім. М. І. Пирогова. Всі етапи досліджень виконані згідно правил гуманного відношення до експериментальних тварин та затвердженні комітетом з біоетики ВНМУ імені М.І. Пирогова (протокол № 7 від 8.06.2015 р.) та Міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами, дотримуючись правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» [174]. Тварини утримувались на стандартному раціоні з доступом до води *ad libitum*, при температурі $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ з 12-годинним освітленням [178, 179]. Ідентифікацію тварин проводили з використанням системи індивідуальних кольорових міток на тілі, при проведенні досліджень враховувались сезонні та циркадні ритми тварин.

Відповідно до мети та завдань дослідження всі експериментальні тварини були поділені на відповідні групи (табл. 2.1).

В дослідженні використані: диклофенак-натрію («Вольтарен»), Novartis; донор гідроген сульфід натрію гідроген сульфід (NaHS) (Sigma, USA), специфічний інгібітор ключового ферменту, який продукує гідроген сульфід (цистатіонін гама-ліазу) – пропаргілгліцин (ППГ) (Sigma, USA).

Всі фармакологічні дослідження виконані на базі сертифікованої МОЗ України лабораторії кафедри фармакології ВНМУ ім. М. І. Пирогова (свідectvo про переатестацію № 000679 від 11.01.2010 р., № 023/13 від 05.03.2013 р.)

Розподіл експериментальних тварин згідно етапів дослідження

№	Етапи дослідження	Щури	Миші
1	Дослідження гострої токсичності NaHS та його комбінації з диклофенаком у щурів та мишей за різних режимів введення	72	57
2	Дослідження гастротоксичності диклофенаку натрію, біохімічних маркерів СОШ, продукції вазоактивних молекул за умов дії диклофенаку натрію на тлі попереднього в/оч введення NaHS та ППГ на тлі попереднього в/оч введення NaHS та ППГ	70	
3	Дослідження змін макроскопічного стану СОШ, секреторної та моторно-евакуаторної функції ШКТ під впливом сумісного інтрагастрального введення диклофенаку натрію та NaHS	40	
4	Дослідження впливу NaHS та ППГ диклофенак-індуковані зміни чутливості мезентеріальних артерій до дії вазодилататорів	35	
5	Дослідження протизапальної та анальгезуючої активності диклофенаку натрію на тлі надлишку та дефіциту гідроген сульфід	100	70
6	Вивчення впливу NaHS на індуковані диклофенаком зміни клітинного циклу та процесів апоптозу в тканинах шлунку	24	
	Всього	341	127

Біохімічні методи дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М. І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво МОЗ України про переатестацію № 002/10 від 11 січня 2010 р.; № 049/15 від 02.03.2015 р.).

Дослідження змін клітинного циклу та аналіз фрагментації ДНК виконували на базі науково-дослідного центру Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (свідоцтво про перереєстрацію № 050/15 від 02.03.2015 р. 2015 р.).

2.1 Вибір доз досліджуваних сполук та визначення параметрів гострої токсичності у щурів та мишей

Для проведення фармакологічних та біохімічних досліджень нами було обрано оптимальну терапевтичну дозу диклофенаку натрію (8 мг/кг), запозичену з літератури [179], що є загальноприйнятою для проведення доклінічних досліджень. Препарат вводили внутрішньошлунково один раз на день в 1 % крохмальному гелі.

DL-пропаргілгліцин є специфічним інгібітором цистатіонін-гама-ліази (одного з основних ферментів-продуцентів гідроген сульфід у тканинах). Згідно численних даних літератури, при проведенні подібних досліджень його вводять в дозах від 25 до 75 мг/кг, але найчастіше – в дозі 50 мг/кг протягом 5 днів. За цих умов ППГ не викликав загибелі тварин [180, 181, 182, 183]. Інформація щодо доз, шляхів та тривалості введення тваринам донору H_2S , за даними літератури, відрізняється значною різноманітністю [184, 185, 186]. Зазвичай в якості ендogenousного інгібітора H_2S -продукуючих ферментів застосовують L-цистеїн, натомість екзогенним донором H_2S найчастіше літератури (розділ 1) та результати попередніх досліджень [187] дали підставу в якості робочої гіпотези вважати, що підвищення рівня в організмі H_2S буде позитивно відбиватись на фармакодинаміці та профілі безпеки диклофенаку натрію та інших препаратів цього фармакологічного класу. Водночас, гідроген

Автор висловлює вдячність завідувачу кафедри біологічної та загальної хімії д.мед.н. Н.В. Заїчко, доц. А.В. Мельнику, а також старшому науковому співробітнику НДЦ ВНМУ імені М.І. Пирогова к.мед.н. І.Л. Черешнюку за кваліфіковану допомогу при виконанні біохімічних та цитологічних досліджень.

сульфід, як відомо, є досить токсичною речовиною, підвищення його концентрації в організмі може викликати симптоми отруєння і навіть смерть. Тому на першому етапі своїх досліджень ми оцінили параметри гострої токсичності NaHS за різних умов його введення.

Дослідження гострої токсичності (LD₅₀) гідроген сульфіду, диклофенаку, та їх комбінації при внутрішньо очеревинному введенні визначали за експрес-методом Т. В. Пастушенка [188]. Досліджувані сполуки вводили одноразово внутрішньоочеревинно (або внутрішньошлунково), спостереження проводили протягом двох тижнів (14 днів). Результати, які ми отримали, представлені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Середньосмертельні дози гідроген сульфіду (LD₅₀)

Доза, мг/кг	Кількість тварин в групі	Кількість тварин, що загинули	LD ₅₀ , мг/кг
Миші, внутрішньоочеревинно			
56,2	3	1	60,2 (51,9÷68,6)
63,0	3	2	
66,8	3	2	
Щурі, внутрішньоочеревинно			
25	3	1	27,2 (22÷32,4)
28,2	3	2	
21,6	3	2	
Щурі, внутрішньошлунково			
63	3	1	68,2 (62÷74,3)
66,8	3	1	
70,8	3	2	

У тварин, які загинули в ході досліду, спостерігалось судоми, переважно нижніх кінцівок та порушення дихання. Смерть наступала переважно протягом 1-ї години після введення. У тварин, що вижили, протягом всього терміну

спостереження не було виявлено відмінності в споживанні їжі та маси тіла у порівнянні з контролем, не було виявлено відхилень в поведінці та жодних клінічних симптомів інтоксикації.

При проведенні доклінічних досліджень в фармакології досить часто використовують такий показник як умовно-терапевтична доза, яка зазвичай складає 1/10-1/20 LD₅₀ [179]. Враховуючи результати наших досліджень, в подальшому ми вводили донор H₂S дозі 3 мг/кг внутрішньоочеревинно для мишей, 1,5 мг/кг внутрішньоочеревинно для щурів та 4 мг/кг внутрішньошлунково для щурів. Ці дози відповідають діапазону умовно-терапевтичних доз і становлять приблизно 1/20 LD₅₀ (табл. 2.1).

Наступним кроком було визначити, чи не зміняться параметри гострої токсичності диклофенаку натрію за умов його сумісного застосування разом із NaHS. Для цього ми визначали LD₅₀ досліджуваної композиції сполук при їх внутрішньоочеревинному введенні щурам (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Вплив NaHS (1,5 мг/кг в/оч) на гостру токсичність диклофенаку натрію у щурів

Доза, мг/кг	Кількість тварин в групі	Кількість тварин, що загинули	LD ₅₀ , мг/кг
Диклофенак натрію внутрішньоочеревинно			
79,4	3	1	85,8 (78,2÷93,3)
84,0	3	2	
89,0	3	2	
Диклофенак натрію + NaHS (1,5 мг/кг внутрішньоочеревинно)			
84,0	3	1	96,3 (89,0÷103,6)
89,0	3	2	
100,0	3	2	

Було встановлено, що NaHS не погіршував параметрів гострої токсичності диклофенаку натрію за умов внутрішньоочеревинного введення щурам. Так, LD₅₀ досліджуваного НПЗЗ при його самостійному введенні

становила 85,8 мг/кг, а при введенні разом із NaHS в умовнотерапевтичній дозі 1,5 мг/кг, цей параметр дорівнював 96,3 мг/кг. Таким чином, ми отримали обґрунтування доз NaHS, які були використані в ході подальших досліджень.

2.2 Моделі надлишку та дефіциту H_2S у тварин

Надлишок H_2S у тварин створювали внутрішньоочеревинним введенням відповідно, донору H_2S – NaHS (Sigma, США) в розрахованій нами дозі 1,5 мг/кг на 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,4), у вигляді свіжовиготовленого водного розчину з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура 1 раз на добу протягом 5 діб. Дефіцит H_2S створювали шляхом введення специфічного інгібітору цистатіонін-гамаліази, D,L-пропаргілгліцину (Sigma, США) в дозі 50 мг/кг у вигляді свіжо виготовленого 5 % водного розчину з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура 1 раз на добу протягом 5 днів. Щурам контрольної групи в/оч вводили еквівалентний об'єм 0,15 М розчину NaCl.

Вміст H_2S в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом в реакції між сульфід-аніоном та пара-фенілендіаміном гідрохлориду у кислому середовищі в присутності іонів заліза (III) [189].

Наші дослідження засвідчили, що у інтактних тварин середній вміст гідроген сульфід у сироватці крові становив $79,75 \pm 2,37$ мкмоль/л. 5-ти денне внутрішньоочеревинне введення донору гідроген сульфід – натрію гідросульфід у розрахованій нами умовно терапевтичній дозі, приводило до статистично вірогідного (на 13,8 %) зростання рівня цього газотрансміттера в сироватці крові, а введення пропаргілгліцину (ППГ), селективного інгібітора синтеза ключового ензима-продуцента H_2S - цистатіонін-гама-ліази (ЦГЛ) – навпаки, вірогідно (на 23,9 %) зменшувало його вміст у тварин. Тобто, введення NaHS та ППГ створювало, відповідно, надлишок та дефіцит H_2S в сироватці крові.

2.3 Дослідження гастротоксичної дії диклофенаку натрію, NaHS, ППГ та їх комбінацій

Для оцінки гастротоксичної дії досліджуваного НПЗЗ, піддослідні тварини були розподілені на декілька груп. І група – інтактний контроль (отримували еквівалентні кількості розчинників). Тваринам II групи внутрішньошлунково 5 днів вводили диклофенак натрію («Вольтарен»), Novartis, 8 мг/кг на 1 % крохмальному гелі. Щурам III та IV груп цей НПЗЗ вводили на тлі надлишку та дефіциту гідроген сульфід, відповідно. Тварини V та VI груп з надлишком та дефіцитом H_2S слугували додатковим контролем. В окремій частині дослідів диклофенак натрію у вищезазначеному режимі вводили через 0,5 години після інтрагастрального введення натрію гідроген сульфід (4 мг/кг). Досліджувані речовини вводили в умовно терапевтичних дозах ($1/20 LD_{50}$), запозичених з літератури, або розрахованих попередньо [179, 190].

Гастротоксичність диклофенаку натрію, NaHS, ППГ та їх комбінацій визначали після внутрішньошлункового введення препаратів один раз на день протягом 7 днів. Евтаназію тварин здійснювали шляхом цервікальної дислокації згідно з вимогами біоетики. Шлунки вилучали, розрізали за великою кривизною, промивали фізіологічним розчином та проводили дослідження СОШ [179, 191].

Стан слизової шлунку оцінювали візуально. Відсутність видимих ушкоджень оцінювалась в 0 балів, наявність набряку та крововиливів, дефекти слизової шлунку діаметром 1-2 мм відносили до виразок першого ступеня важкості (1 бал), декілька виразок невеликого розміру (2-3 мм) - до другого ступеня важкості (2 бали), виразки більше 3 мм - до третього ступеня важкості (одна – 3 бали, кілька – 4 бали). Перфоративні та пенетруючі в сусідні органи виразки відносили до пошкоджень четвертого ступеню важкості (5 балів). Множинність пошкодження оцінювали як середню кількість виразок на одну тварину. Важкість виразок розраховували як середню суми добутків – (кількість виразок x ступінь важкості). Виразковий індекс (ВІ) вираховували за формулою [191]:

$$BI = \frac{\text{середня арифметична суми балів} \times \% \text{ тварин з виразками}}{100}$$

Крім цього, оцінювали також зовнішній вигляд і загальний стан тварин (спостерігали за поведінкою, рефlekсами, зокрема «харчовим», станом шерсті, тощо) та додаткові показники стану ШКТ (наявність здуття шлунку та кишечника) та СОШ, а саме наявність гіперемії, геморагій, набряку, порушень складчастості останньої. Наведені показники оцінювали за їх вираженістю у балах: 0 балів – ознака відсутня, 1, 2, 3 – ознака виражена слабо, помірно, сильно, відповідно.

Дослідження змін секреторної та моторної функції ШКТ. При вивченні виразкової та можливої противиразкової дії фармакологічних речовин передбачене вивчення їхньої дії на секреторну та моторну функції ШКТ [179]. Відомо, що нормальний ритм евакуації шлункового вмісту у дванадцятипалу кишку є одним із визначальних факторів регуляції секреції ферментів, хлористоводневої кислоти, гастродуоденальних гормонів. В умовах патології (виразкова хвороба, гастрит, та ін.) виникає порушення нормальної регуляції секреторної та моторної функції шлунка. Ці порушення можуть стати одним з патогенетичних механізмів виразкової хвороби, зумовлюючи цілу низку тяжких симптомів [179].

Так, вплив на секрецію шлункового соку проводили за методом А. І. Андрєвої [179, 192]. Піддослідних щурів витримували 48 годин на голодній дієті без обмеження пиття води. Через 1 годину після останнього внутрішньошлункового введення тваринам досліджуваних сполук та їх композицій, щурів наркотизували внутрішньоочеревинним введенням нембуталу (40 мг/кг), розтинали черевну порожнину, накладали лігатуру на пілоричний сфінктер шлунка, а через 4 години накладали лігатуру на кардіальний сфінктер шлунка. Тварин виводили з експерименту в умовах евтаназії, забирали шлунковий вміст. Інтенсивність секреції шлункового соку перераховували на 100 г маси тварини. У одержаному соку вимірювали загальну кислотність, яку визначали шляхом титрування шлункового соку 0,1N розчином гідроксиду натрію у присутності індикатору фенолфталеїну. Загальну

кислотність виражали числом мл 0,1N розчину гідроксиду натрію, необхідного для нейтралізації 100 мл шлункового соку.

Вивчення евакуаторної функції шлунка та моторної функції кишечника визнали за допомогою методу «міток» [179]. Тварин протягом 24 годин витримували на голодній дієті без обмеження питної води. Всім тваринам внутрішньошлунково вводили по 0,5 мл контрастної маси (10 % суспензія активованого вугілля в 1 % крохмальному гелі). Через 40 хвилин тварин виводили з експерименту в умовах евтаназії нембуталом. Потім у дослідних та контрольних тварин вимірювали (в см) абсолютну довжину кишечника та шляху (в см), пройденого контрастною масою по ньому, а відсоток довжини кишечника, пройдений контрастною масою, по відношенню до абсолютної довжини останнього, був інтегральним показником, який характеризує перистальтику ШКТ.

2.4. Експериментальні моделі оцінки фармакологічних ефектів диклофенаку натрію, NaHS, ППГ та їх комбінацій

Для визначення антиноціцептивної дії диклофенаку за умов додаткового введення донору та інгібітору синтезу гідроген сульфїду, тваринам зі змодельованим дефіцитом та надлишком H_2S (див п. 2.2) вводили досліджуваний НПЗЗ в оптимальній терапевтичній дозі (8 мг/кг в шлунок в 1 % крохмальному гелі).

Знеболюючий ефект визначали на моделі електричного подразнення слизової оболонки прямої кишки [193], яке відтворювали в спеціальній камері, використовували апарат ЕСЛ-2, який генерував електричні імпульси з частотою 100 Гц, тривалістю 5 мсек і затримкою 5 мсек. За поріг больової чутливості (ПБЧ) приймали таку напругу електричного струму, яка викликала ноцицептивну реакцію у щурів, яку реєстрували по вокалізації, імерсії хвоста та (або) відсмикуванню лап від токопровідної поверхні дна камери. Порівнювали вихідні значення ПБЧ та зміни його через 1, 2, 4 та 6 годин після одноразового введення препаратів.

Більш детальні дослідження центральної та периферичної компонентів антиноцицептивної дії проводили за допомогою **формалінового тесту** [194, 195, 196]. Щурам субплантарно вводили 0,1 мл 5 % розчину формаліну. Ноцицептивна реакція проявлялась в дві стадії у вигляді підняття та періодичного похитування лапи, а також її покусування чи облизування. Перша (центральна) фаза болю виникала одразу ж після короткого латентного періоду внаслідок безпосереднього хімічного подразнення больових рецепторів і триває від 3 до 10 хвилин, в середньому 4-5 хвилин. Після першої фази наставав латентний період другої фази (20-30 хвилин), який характеризувався заспокоєння тварини і тимчасовим зникнення болю. Розвивалось асептичне запалення лапки щура і проникнення в його осередок біологічно активних речовин (простагландинів, брадикініну та ін.), що супроводжувалось підвищенням проникності судин, гіперемії, набряку кінцівки і появи ознак больової чутливості. Спостереження за тваринами проводилось протягом 60 хвилин після введення формаліну, після чого зазвичай ознаки больової чутливості вщухали. Зміни тривалості латентного періоду 2 фази та ноцицептивної реакції в цій фазі свідчили про силу знеболюючої дії препаратів.

Протизапальну дію препаратів вивчали на моделі карагенінового та формалінового набряку кінцівки у мишей та щурів, відповідно. Ці моделі використовуються в експериментальній фармакології для виявлення та оцінки можливих протизапальних властивостей нових фармакологічно активних речовин [179].

Карагенін (Sigma USA) вводили субплантарно 0,1 мл 1 % розчину в праву задню кінцівку миші [179]. Відомо, що ексудативна фаза запалення, яка настає після альтерації тканин, відіграє важливу роль у розвитку всього комплексу тканинних змін при запаленні. Провідним механізмом у розвитку ексудативної реакції є порушення проникності судин мікроциркуляторного русла, яке розвивається під дією медіаторів запалення. Зокрема, за даними Di Rosa зі співавторами [179], у перші 30-90 хвилин патогенезу розвитку карагенінового набряку беруть участь гістамін та серотонін, в інтервалі між 1,5-2,5 годинами – кініні, а між 2,5-5,5 годинами – простагландини. На 3-й годині

(піку розвитку) після введення флогогену під легким ефірним наркозом здійснювали евтаназію тварин та виконували екзартикуляцію ураженої та здорової кінцівки в тазостегнових суглобах та порівнювали їх масу за допомогою аптечних вагів. Антиексудативну активність (АЕА) визначали за ступенем зменшення набряку в досліджуваних групах в порівнянні з контролем і виражали в відсотках, розраховуючи за формулою [179]:

$$AEA = \frac{\Delta V_k - \Delta V_{оп}}{\Delta V_k} \times 100\%,$$

де АЕА - антиексудативна активність у %;

ΔV_k - середня різниця маси між набряклою і здоровою кінцівкою в групі контролю;

$\Delta V_{оп}$ - середня різниця маси між набряклою і здоровою кінцівкою в дослідній групі.

Формаліновий набряк моделювали шляхом субплантарного введення 0,1 мл 5 % розчину формаліну (Sigma USA). Виміри товщини набряклої та ненабряклої кінцівки виконували через 1 годину після введення флогогену за допомогою лабораторного мікрометра. Антиексудативну активність визначали за формулою, що наведена вище.

Диклофенак (8 мг/кг в шлунок на 1 % розчині крохмалю) вводили за 1 годину до ін'єкції флогогенів, NaHS та ППГ вводили внутрішньочеревно за 30 хвилин до субплантарного введення флогогенів. Протинабрякову активність диклофенаку визначали в порівнянні з контрольними тваринами (яким вводили еквівалентну кількість розчинника).

2.5 Біохімічні методи досліджень

Досліди проведені на 70 щурах масою 180-200 г. Евтаназія тварин виконували цервікальною дислокацією. Після розтину черевної порожнини,

виділяли шлунок, робили розтин по великій кривизні, промивали його в фізіологічному розчині калію хлориду. Для біохімічних досліджень виділяли СОШ, перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду і гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду (співвідношення 1:3). Гомогенати центрифугували упродовж 30 хв при 600 g, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при температурі 20°C.

Активність цистатіонін-γ-ліази (КФ 4.4.1.1) визначали за кількістю утвореного H_2S після інкубації в середовищі, що містить піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеїн 3,3 мМ, трис-буфер 0,083 М (рН 8,5). Активність ферменту виражали в нмоль/хв. на 1 мг протеїна.

Продукцію H_2S оцінювали за приростом сульфід-аніону, вміст якого визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [197]. Вміст H_2S в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом, заснованим на утворенні тіоніну (барвника фіолетового кольору, здатного до флюоресценції) в реакції між сульфід-аніоном та пара-фенілендіаміном гідрохлориду у кислому середовищі в присутності іонів заліза (III) [198]. Вміст H_2S в СОШ визначали за методикою [199]. СОШ промивали холодним 1,15 % розчином KCl, гомогенізували в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50 % ТХО, центрифугували при 1200 g 15 хв., в супернатанті визначали вміст H_2S спектрофотометричним методом за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності $FeCl_3$. Всі маніпуляції проводили у стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf (для попередження втрат H_2S). Вміст сульфід-аніону в пробі розраховували за калібрувальним графіком. Стандартом слугували водні розчини $Na_2S \times 9H_2O$ (Sigma, США) з концентрацією 31,2-3120 мкМ. Вміст H_2S в сироватці крові виражали в мкмоль/л, в СОШ – в нмоль/мг протеїна.

Суму нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависю цинкового порошку в розчині аміаку [200]. Сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS) встановлювали за кількістю

утвореного нітрит-аніону (NO_2^-) після інкубації протягом 120 хв. в середовищі, 1 мл якого містив 50 мМ KH_2PO_4 -NaOH-буфер (pH 7,0), 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ NADPH, 2,2 мМ L-аргініну [201]. Зазначені показники виражали в нмоль/г тканини, та пмоль/хв. на 1 мг протеїна, відповідно.

Активність простагландин-ендопероксид синтази - PGH-синтази (КФ 1.14.99.1) визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненої форми донору електронів адреналіну [202] і виражали в нмоль/хв. на 1 мг протеїна.

Активність NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1) визначали за поглинанням NADPH при 340 нм [203], виражали в нмоль/хв. на 1 мг протеїна, активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) визначали за здатністю гальмувати окиснення кверцетину, виражали в ум.од./мг протеїна [204].

Вміст протеїну визначали мікробіуретовим методом [205], виражали в мг/мл; вміст малонового діальдегіду (МДА) - за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [206]; вміст карбонільних груп білків (КГ) - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [207], ці показники виражали в нмоль/мг протеїна.

Рівень глікозаміногліканів (ГАГ) оцінювали за вмістом в них гексозамінів за реакцією з пара-диметилбензальдегідом, і виражали в мг/г тканини [208]. Фракції фосфоліпідів визначали методом тонкошарової хроматографії на силікагелі Л5/40 (Chemapol, Чехія), використовуючи систему розчинників хлороформ-метанол-вода у співвідношенні 65:30:5 (за об'ємом). Ідентифікацію фракцій фосфоліпідів – фосфатидилхоліну (ФХ), лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), фосфатидилетаноламіну (ФЕА) проводили за допомогою якісних реакцій та за величинами R_f , а кількісну оцінку проводили після хроматографії за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом. Ці показники виражали в мкг/мг протеїна [209].

2.6 Методика реєстрації скоротливості гладком'язових препаратів мезентеріальних артерій

Досліди проведені на 35 щурах масою 220-250 г. Евтаназію тварин викликали шляхом дислокації шийних хребців. Після розтину черевної порожнини виділяли мезентеріальну артерію та відразу поміщали їх у стандартний буферний розчин Кребса (склад в кінцевих концентраціях, мМ: 132 натрію хлориду, 4,7 калію хлориду, 1,4 натрію дигідрофосфату, 1,0 кальцію хлориду, 12,5 натрію гідрокарбонату та 5,6 глюкози). рН цього розчину доводили до 7,4 шляхом продування сумішю газів (95 % кисню та 5 % карбону диоксиду). За допомогою препарувальних голок судини фіксували на парафіновому дні препарувальної чашки, заповненої розчином Кребса. Під бінокулярним мезентеріальну судину звільняли від сполучної тканини та згустків крові. Відпрепаровані ділянки судин розрізали на кільцеві сегменти завширшки 2-3 мм під кутом близько 45° , оскільки стінка цих судин складається переважно з кільцевих м'язових шарів. Отримані судинні препарати залишали у розчині Кребса при кімнатній температурі на 45-60 хв до перенесення їх у робочу перфузійну камеру. Гладком'язові препарати досліджуваних судин поміщали в робочу камеру, виготовлену із плексигласу, об'ємом 0,5 мл між гачком і датчиком напруження та розтягували під постійним навантаженням 0,015-0,02 Н, що дозволяє отримати оптимальну силу скорочення судинних препаратів.

В дослідах тензометрично реєстрували зміни тонуусу ізольованих препаратів судин в режимі, що наближався до ізометричного за допомогою тензометричної установки, створеної в ДУ «Інститут фізіології АМН України ім. О. О. Богомольця», за загальноприйнятою методикою [210, 211]. Судинні сегменти в камері суперфузували буферним розчином Кребса із сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою перистальтичного насоса. Суперфузійний буферний розчин Кребса термостатували із постійною температурою 37°C за допомогою системи підігріву розчину. Зворотний контроль температури здійснювали за допомогою термодатчиків, розташованих на виході перфузійної

системи із камери, вході до камери та власне в камері. Аплікацію застосованих фармакологічних агентів здійснювали за допомогою перфузійної системи.

До початку експерименту судинні сегменти витримували у перфузійній камері протягом 40-60 хвилин. Після цього починали періодичну стимуляцію гладком'язевих клітин за допомогою гіперкалієвого буферного розчину із вмістом іонів K^+ 80 мМ до отримання стабільних скоротливих відповідей, з метою досягнення оптимального режиму роботи гладеньких м'язів судин. Після досягнення стабільного скорочення, м'язові смужки промивались стандартним розчином Кребса (3 рази по 30 хв.).

Для оцінки H_2S -стимульованого розслаблення мезентеріальну артерію, передскорочені фенілефрином ($10^{-6}M$), перфузували розчинами, що містили одночасно фенілефрин ($10^{-6}M$) та H_2S в різних концентраціях (10^{-2} - $10^{-6}M$), протягом 15 хв кожний, після чого реєстрували зміни ізометричного напруження у відсотках відносно такого значення на тлі дії самого фенілефрину.

Ефективну концентрацію (EC_{50}) гідроген сульфід у розраховували методом апроксимації S-подібними кривими.

Використані фенілефрин, ацетилхолін, виробництва «Sigma» (США), інші реактиви були виробництва країн СНД.

2.7 Цитометричні методи дослідження

Досліди виконані на 24 нелінійних щурах-самцях, віком 10-12 тижнів середньою масою 180-250 г, які утримувались в умовах віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Тварин були поділені на 4 групи. Тваринам I групи вводили дикфенак натрію (8 мг/кг в/шл), тваринам II групи – натрій гідрогенсульфід в розрахованій нами умовнотерапевтичній дозі (1,5 мг/кг в/оч). Тварини III групи отримували обидві сполуки. Тваринам IV групи (контроль) вводили еквівалентні кількості розчинників в аналогічних кількостях та режимах введення. Досліджувані сполуки вводили протягом 3 діб, перший раз – на тлі звичайного харчування,

другий і третій рази – на тлі голодування з вільним доступом до води. Евтаназію тварин здійснювали через 6 годин після останнього введення диклофенаку, NaHS та їх комбінації шляхом цервікальної дислокації. Вилучений шлунок розтинали по малій кривизні, промивали в ізотонічному розчині калію хлориду та здійснювали забір матеріалу зі слизової оболонки на відстані 0,5 см від воротаря за допомогою трепана. Вміст ДНК в ядрах клітин слизової оболонки шлунка щурів визначали методом проточної ДНК-цитометрії.

Суспензії ядер з клітин слизової оболонки шлунка щурів отримували за допомогою спеціального набору для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 2 фірми Partec, Німеччина, відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний набір дозволяє виконувати екстракцію ядер та маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались спеціальні одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі «Partec PAS» фірми Partec, Німеччина. Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії реєструвалось 20 тис. подій.

Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності згідно математичної моделі, де визначались:

G0G1 - процентне співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2с);

S - процентне співвідношення фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2с та < 4с.);

G2 + M – відсоткове співвідношення фази G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4с);

IP - індекс проліферації, який визначали за сумою показників S + G2 + M;

ВР - блок проліферації, який оцінювали по співвідношенню $S/(G2 + M)$ (збільшення числа клітин в фазі $G2 + M$ при низьких значеннях S-фази свідчить про затримку проліферації в стадії $G2 + M$).

Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом визначення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах – RN1 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК $< 2c$.

2.8. Методи статистичної обробки результатів

Математичну обробку отриманих даних проводили за допомогою методів варіаційного та персентильного аналізу з використанням пакету прикладних програм «STATISTICA 6.1» (належить НДЦ ВНМУ імені М. І. Пирогова, ліцензійний № BXXR901E246022FA) [212, 213] із застосуванням непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів, середні значення кожної ознаки, що вивчалася, та стандартне квадратичне відхилення. Достовірність різниці між незалежними кількісними величинами при монофакторіальному аналізі визначали за допомогою U-критерія Мана-Уїтні, при поліфакторіальному – за допомогою кутового перетворювача Фішера, критерію Крускала-Уоллеса-Вілкоксона та медіанного тесту. Кореляційний аналіз проводився з вираховуванням коефіцієнта кореляції (r) Пірсона. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Матеріали цього розділу відображені в наступних публікаціях:

1. Таран І. В. Гостра токсичність гідроген сульфіді та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Медична хімія. – 2011. – Т.13. – №4 (49). – С. 88–91.

2. Таран І. В. Вплив гідроген сульфіді на гостру токсичність та протизапальний ефект диклофенаку у мишей / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011, №1. – С. 45

(Актуальні проблеми сучасної медицини : науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю. Київ, 12-14 жовтня 2011 р. : матеріали).

3. Taran I. V. Experimental Evaluation The Influence Of Hydrogen Sulfide On The Pharmacological Effect And Toxicity Of Diclophenac Sodium / N. I. Voloshchuk, I. V. Taran // Перший Україно-Йорданський конгрес, 12-17 вересня 2011р., Вінниця : матеріали. – Вінниця, 2011. – С. 36-37.

РОЛЬ МОДУЛЮВАННЯ ВМІСТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ У РЕАЛІЗАЦІЇ ЗАХИСНОГО ПОТЕНЦІАЛУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ

Протекторна роль слизової оболонки шлунка (СОШ) зумовлена існуванням цілої низки захисних факторів і підтримується певними захисними механізмами. Ці механізми можна умовно поділити на передепітеліальні, епітеліальні та постепітеліальні [54, 55, 56, 215]. Передепітеліальні фактори захисту СОШ представляють собою так званий слизистий бікарбонатно-фосфоліпідний «бар'єр», що створюють клітини поверхневого епітелію шлунку, які продукують слиз, бікарбонати, фосфоліпіди, пептиди, білки теплового шоку, та деякі інші біологічно активні речовини, які нейтралізують і сповільнюють зворотню дифузію іонів гідрогену з просвіту шлунку до слизових клітин. Епітеліальний компонент захисту визначається стійкістю поверхні епітеліальних клітин і міжклітинних контактів до зворотної дифузії іонів гідрогену, гідрофобними властивостями слизової оболонки, які сприяють «відштовхуванню» хлороводневої кислоти, а також досить високою здатністю епітеліальних клітин до проліферації. Однак найбільш важливе значення в механізмах захисного бар'єру СОШ, як вважають, відіграють постепітеліальні фактори, зокрема, простагландини (ПГ) – ПГЕ2 та ПГІ2 [56]. Ці молекули проявляють цитопротекторну дію, зменшують утворення хлороводневої кислоти в шлунку, підвищують секрецію слизу та бікарбонату, а окремі з них - ПГІ2 (простациклін) – мають вазодилатуючі властивості. Крім них, у забезпеченні адекватної мікроциркуляції СОШ беруть активну участь інші вазоактивні молекули (нітроген монооксид та гідроген сульфід). Здатність порушувати нормальне функціонування одного чи декількох компонентів захисної системи і лежить в основі дії гастротоксичних чинників.

Метою цієї частини роботи було визначити ступінь змін різних рівнів захисту слизової СОШ, які виникають на тлі модулювання вмісту гідроген сульфіду в організмі.

3.1 Дослідження макроскопічного стану слизової оболонки шлунку на тлі модулювання рівня гідроген сульфіду у інтактних щурів

Для проведення цієї частини дослідження тварини були розподілені на 3 групи по 10 щурів. Надлишок та дефіцит гідроген сульфіду у тварин створювали внутрішньоочеревинним введенням відповідно, донору гідроген сульфіду – NaHS (Sigma, США) в дозі 1,5 мг/кг на 0,1М фосфатному буфері (pH 7,4), а також специфічного інгібітору синтезу цього газотрансміттера, пропаргілгліцину (Sigma, США) в дозі 50 мг/кг протягом 5 днів. Зазначені дози не викликали загибелі тварин, і були запозичені з літератури або розраховані у попередніх дослідженнях (див. розділ 2). Вміст H_2S в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом [88]. Тварини інтактного контролю отримували відповідні кількості розчинників. Наприкінці досліду здійснювали евтаназію тварин шляхом цервікальної дислокації згідно вимог біоетики. Шлунки вилучали, розрізали за великою кривизною, промивали та проводили візуальне дослідження слизової оболонки шлунку (СОШ), оцінювали наявність здуття шлунку та кишечника, гіперемії, геморагій, набряку, порушень складчастості, а також визначали наявність виразок різного ступеня важкості та виразовували виразковий індекс (ВІ) за формулою [191].

Результати, отримані в дослідженні засвідчили, що у інтактних тварин середній вміст H_2S в сироватці крові становив $79,75 \pm 2,37$ мкмоль/л (рис.3.1). 5-ти денне внутрішньоочеревинне введення донору H_2S – натрію гідрогенсульфіду (NaHS) в умовно терапевтичній дозі, приводило до статистично вірогідного (на 13,8 %) зростання рівня цього газотрансміттера в сироватці крові в середньому до $90,3 \pm 4,37$ мкмоль/л, а введення пропаргілгліцину (ППГ), селективного інгібітора синтезу ключового ензима-продуцента H_2S - цистатионін-гама-ліази (ЦГЛ) – навпаки, вірогідно (на 23,9 %)

зменшувало його вміст у тварин, середній рівень якого в цій групі становив $60,7 \pm 5,75$ мкмоль/л. Тобто, введення NaHS та ППГ створювало, відповідно, надлишок та дефіцит H_2S в сироватці крові.

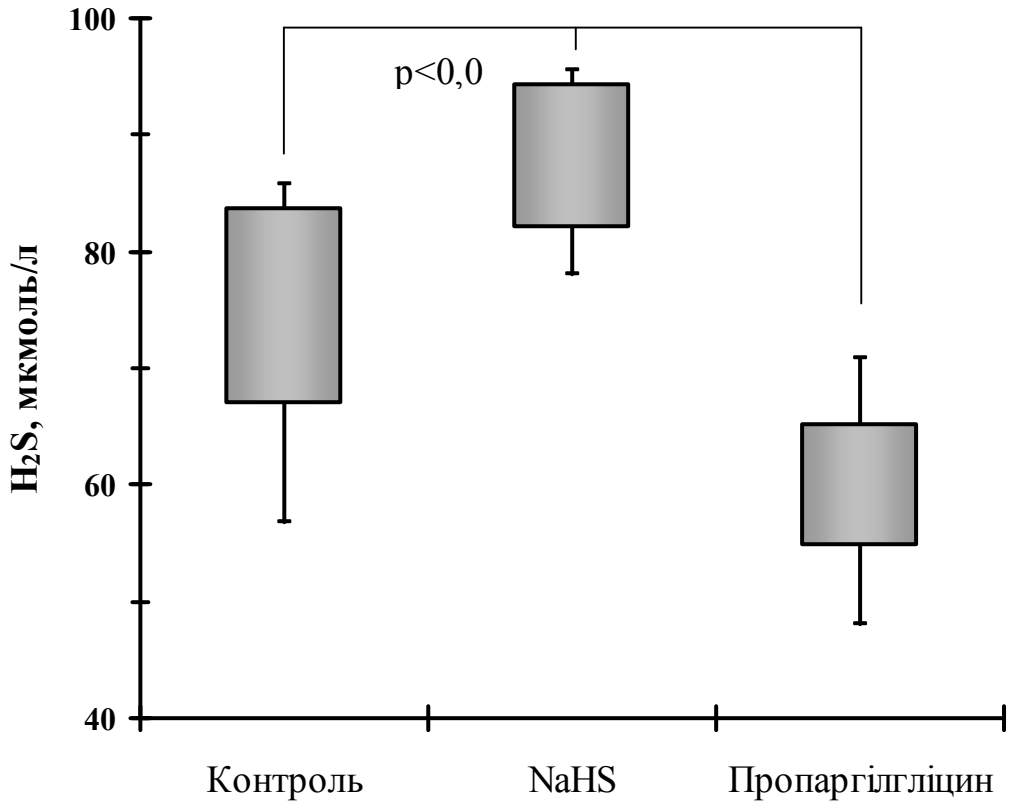


Рис. 3.1 Вплив NaHS та ППГ на вміст H_2S в сироватці крові щурів. Бокси включають результати з 25 по 75 перцентиль, вертикальні лінії за межами боксів - мінімальний та максимальний результат.

Оцінка поведінкових реакцій та макроскопічного стану СОШ у щурів, яким проводили додаткове введення NaHS та ППГ не виявило суттєвих змін у досліджуваних показниках за цих умов експерименту. Щури групи інтактного контролю були активними, рефлексорна збудливість не порушена, шкіряний покрив залишався охайним та гладким, процеси сечовиділення та дефекації, споживання води та їжі були в нормі. При макроскопічному дослідженні їх шлунків не спостерігали ніяких дефектів СОШ (табл. 3.1).

Вплив натрію гідроген сульфіді та пропаргілгліцину на макроскопічні показники СОШ Ме (LQ; UQ)

Показники	Експериментальні групи, (n=10)		
	Інтактні	Натрію гідроген сульфід	Пропаргілгліцин
Здуття, бали	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (1; 2)
Геморагії, бали	0 (0;0)	0 (0;0)	1,5 (1; 2)
Гіперемія, бали	0 (0;0)	1 (0;1)	0 (0;0)
Набряк, бали	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (1; 2)
Порушення складчатості, бали	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
Кількість виразок на 1 тварину	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
Виразковий індекс, бали	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)

Примітка: * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;

На тлі 5-ти денного введення натрій гідрогенсульфіді не було зафіксовано ніяких змін поведінкових реакцій, при макроскопічному дослідженні СОШ лише у 1 тварини було зафіксовано ознаки гіперемії без змін інших показників. Пропаргілгліцин також не сприяв погіршенню загального стану, харчового рефлексу та поведінки щурів. Однак, на тлі його введення нами були помічені деякі зміни макроскопічних ознак цілісності шлунку: у трьох тварин спостерігалось здуття шлунку, набряк слизової оболонки легкого та середнього ступенів, а також у 4 тварин були знайдені геморагічні зміни слизової без порушень складчатості.

Тобто, в дозах, які були використані в нашому дослідженні, вказані сполуки не впливали на макроскопічну цілісність шлунку тварин та не змінювали загального стану та поведінкових реакцій у піддослідних тварин протягом всього терміну експерименту.

3.2 Оцінка впливу надлишку та дефіциту гідроген сульфідів на зміни біохімічних маркерів стану слизової оболонки шлунку інтактних щурів

Для біохімічних досліджень виділяли СОШ, отримували постядерний супернатант та визначали основні біохімічні маркери, які віддзеркалюють стан захисних властивостей СОШ: вміст ГАГ, фосфоліпідний спектр, показники оксидантно-антиоксидантної рівноваги, як описано в розділі 2.

Визначення вмісту глікозаміногліканів в слизовій шлунку показало, що на тлі введення донору гідроген сульфідів цей показник вірогідно ($p < 0,05$) зростав на 16,6 % і становив $4,78 \pm 0,12$ мг/г тканини, тоді як пропаргілгліцин – навпаки, зменшував продукцію захисного шару слизу в шлунку, про що свідчить зменшення показника ГАГ на 18,5 % ($p < 0,05$), що відповідає $3,34 \pm 0,09$ мг/г тканини проти $4,1 \pm 0,11$ мг/г тканини у тварин контрольної групи (рис. 3.2).

Структурна організація клітинних мембран правильне співвідношення її ліпідних компонентів, що лежать в основі будови ліпідних рафтів, зумовлюють основні біологічні функції клітинних мембран і забезпечують стійкість клітин до дії пошкоджуючих факторів [215]. Показники фосфоліпідного складу клітинних мембран цілком адекватно відображають ступінь цілісності мембран клітин. Фосфоліпіди входять до складу мембран всіх клітин, беруть участь у транспорті ліпідів з печінки в інші органи і тканини, в жировому обміні, у побудові клітин нервової тканини, печінки, запобігають формуванню виразок у шлунково-кишковому тракті, забезпечують виведення шлаків з клітин.

Відомо, що важливу роль в перебігу та прогресуванні патологічних процесів шлунку відіграють структурно-функціональні зміни клітинних мембран СОШ. Фосфоліпіди виконують не тільки структурну роль у мембранних структурах, а і забезпечують оптимальні умови для

функціонування поліферментних систем, які активно впливають на внутрішньоклітинний метаболізм. Нами були оцінені зміни фосфоліпідного складу СОШ інтактних щурів за умов попереднього введення донору H_2S та ППГ.

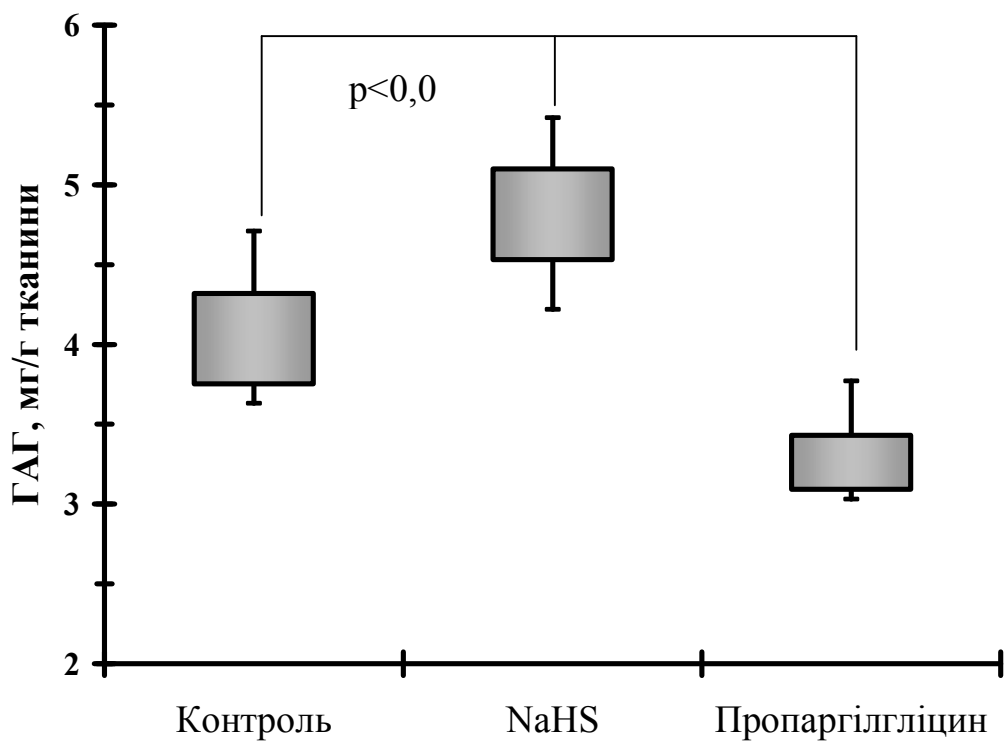


Рис. 3.2. Вплив різної насиченості організму щурів H_2S на вміст глікозаміногліканів (ГАГ). Бокси включають результати з 25 по 75 персентиль, вертикальні лінії за межами боксів - мінімальний та максимальний результат.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що в клітинах слизової оболонки шлунка інтактних тварин найбільше міститься фосфатидилхоліну (ФХ) та фосфатидилетаноламіну (ФЕ) (в середньому 42,9 та 23,5 %, відповідно) від загальної суми фосфоліпідів (ФЛ), а вміст лізофосфатидилхоліну (основного продукту метаболізму фосфатидилхоліну) був найменшим (6,44 %).

Створення дефіциту H_2S змінює зазначене співвідношення, а саме викликає зменшення загального вмісту фосфоліпідів та фосфатидилхоліну на 17,9 і 18,6 %, відповідно ($p<0,05$) із одночасним зростанням вмісту лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) на 21,8 % ($p<0,05$) (табл. 3.2). Співвідношення

ФХ/ФЕ та ФХ/ЛФХ за цих умов експерименту зменшувались приблизно в однаковій мірі (на 33 % в середньому). Зростання лізофосфоліпиду, яке ми отримали, може бути результатом дії оксидативного стресу та активацією фосфоліпази А₂ [216]. ЛФХ, як відомо належить до біологічно активних амфифільних сполук, які змінюють плинність мембран [217], а при високих концентраціях виявляють токсичний вплив на функціонування клітин. Крім того, ЛФХ стимулює утворення супероксид-аніона O₂-• в різних типах клітин [218], і, отже, здатен спричинювати оксидативний стрес в слизовій шлунку.

Таблиця 3.2

Вплив різної насиченості організму щурів H₂S на фосфоліпідний спектр СОШ
(M±m)

№ з/п	Фосфоліпіди, мкг/мг протеїна	Групи тварин (n=10)		
		Контроль	NaHS	Пропаргілглцін
1	Загальні ФЛ	256±7,06	275±6,9	210±7,70*
2	ФХ	110±6,15	118±6,01	89,5±5,19*
3	ФЕ	60,2±4,24	57,4±4,33	72,1±3,26*
4	ФХ/ФЕ	1,87±0,11	2,13±0,15	1,25±0,06*
5	ЛФХ	16,5±1,16	13,5±0,65*	20,1±1,16*
6	ФХ/ЛФХ	6,80±0,35	8,79±0,31	4,50±0,23

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності (p<0,05) відносно контрольної групи тварин

На противагу цьому, додаткове введення піддослідним тваринам донору H₂S викликало позитивні зміни у фосфоліпідному спектрі СОШ. Однак ступінь виразності позитивних змін була меншою, ніж негативний вплив дефіциту H₂S. Так, нами було виявлено сприяло зростанню загального вмісту фосфоліпідів на 7,4 % порівняно з контролем. Аналіз ліпідного складу СОШ – фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну – показав невірогідне зростання

першого показника (на 7,2 %) та зменшення другого (на 4,6 %), проте ці зміни не сягали статистично значущого рівня. Натомість було встановлене вірогідне зменшення вмісту ЛФХ (на 18,2 %, $p<0,05$) порівняно з контролем в групі тварин, які отримували донор H_2S , що може свідчити на користь антиоксидантної дії останнього.

Докази цієї гіпотези були отримані в наступній частині роботи при аналізі стану оксидантно-антиоксидантної рівноваги СОШ у щурів за умов модулювання вмісту H_2S .

Експериментальне створення надлишку та дефіциту H_2S в організмі по-різному відбивається на оксидантно-антиоксидантній рівновазі в слизовій шлунку (табл. 3.3). А саме, введення NaHS зменшувало пероксидацію ліпідів і білків, про що свідчить вірогідне ($p<0,05$) зменшення вмісту МДА та КГП на 19,4 та 17,1 %, відповідно.

Таблиця 3.3

Вплив різної насиченості організму щурів H_2S на вміст продуктів пероксидації ліпідів та білків в СОШ ($M\pm m$)

№ з/п	Групи щурів (n=10)	МДА, нмоль/мг протеїна	КГП, нмоль/мг протеїна
1	Контроль	6,65±0,30	2,28±0,09
2	NaHS	5,36±0,18*	1,89±0,06*
3	Пропаргілгліцин	8,12±0,28*	2,71±0,10*

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($p<0,05$) відносно контрольної групи тварин

На противагу цьому, ППГ вірогідно підвищував вміст продуктів пероксидації (вміст МДА зростав на 22,1 % а КГП – на 18,5 % ($p<0,05$)).

Ступінь виразності оксидативних змін та показників антиоксидантного захисту, як відомо, в значній мірі співставлялись з активністю відповідних ферментів - НАДФН-оксидази та супероксиддисмутази (СОД). Наші результати

дозволили зробити висновок, що збільшення вмісту H_2S в крові супроводжувалось збільшенням активності СОД та зменшенням активності НАДФН-оксидази (на 15,6 та 14,3 %, відповідно, $p<0,05$). ППГ за цих умов експерименту чинив протилежну дію: на тлі його 5-ти денного введення активність СОД зменшувалась на 18,3 % ($p<0,05$), а активність НАДФН-оксидази збільшувалась на 19,0 % ($p<0,05$).

Таблиця 3.4

Вплив різної насиченості організму щурів H_2S на стан про-антиоксидантної системи СОШ ($M\pm m$)

№ з/п	Групи щурів (n=10)	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв. на 1 мг протеїна	СОД, ум.од./мг протеїна
1	Контроль	1,05 $\pm$ 0,05	1,86 $\pm$ 0,05
2	NaHS	0,90 $\pm$ 0,03*	2,15 $\pm$ 0,08*
3	Пропаргілгліцин	1,25 $\pm$ 0,07*	1,52 $\pm$ 0,07*

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($p<0,05$) відносно контрольної групи тварин

Отримані дані засвідчують зміни основних біохімічних параметрів СОШ на тлі модулювання вмісту H_2S в організмі. При цьому введення донору гідроген сульфїду збільшувало продукцію слизу, виявляло цитопротекторну дію та супроводжувалось зменшенням процесів оксидативного стресу з одночасним підвищенням ступеню антиоксидантного захисту. Введення ППГ викликало інверсію всіх вивчаємих показників. Варто зазначити, що дефіцит H_2S більше, ніж його надлишок, негативно змінював захисний потенціал СОШ за ступенем виразності зазначених змін.

3.3 Оцінка впливу надлишку та дефіциту гідроген сульфїду на продукцію вазоактивних молекул (гідроген сульфїду, нїтроген монооксиду та простагландинів) в шлунку їнтактних щурів

В механїзмах розвитку пошкоджень шлунку одну з найбільш важливих ролей відіграють порушення мікроциркуляції, що виникають внаслідок гіперпродукції вазоконстрикториних та зменшенням вмісту вазодилатуючих молекул.

В літературі описані ціла низка біологічно активних речовин ендотеліального та плазменного походження, які регулюють тонус судин. Серед цих медіаторів до терапевтичного та токсичного впливів НПЗЗ причетні простагландини (Pgl_2 , $\text{Pgf}_{2\alpha}$), вільні радикали кисню, оксид азоту, а також, як було нещодавно встановлено [34, 98] гідроген сульфїд.

Тому в цій частині роботи дослідили зміни активності ферментів-продуцентів вазоактивних молекул – простагландин-Н-синтази, NO-синтази, цистатіонін- γ -ліази в слизовій оболонці шлунку щурів, а також оцінено паттерн відмінностей у вазорелаксуючому ефекті H_2S і модуляцію його під впливом досліджуваних сполук.

В дослідженнях *in vivo* щурі були розділені на групи: 1 група – їнтактний контроль (отримували еквівалентну кількість розчинників за аналогічних режимів введення). Щурам 2-ї і 3-ї груп вводили, відповідно, NaHS та ППГ в дозах і режимах, як описано раніше. В дослідях *in vitro* тензометрично реєстрували тонус ізольованих фрагментів мезентеріальної артерії щурів та його зміни за умов передінкубації з NaHS та ППГ, як описано в розділі 2.

Виявилось, що екзогенне введення донору H_2S викликало елевачію активності ключового ферменту його синтезу в шлунку (цистатіонін-гамма-ліази) та загального його вмісту в СОШ на 15,7 та 12,7 %, відповідно. В групі щурів яким вводили ППГ, ці показники були меншими за контроль (на 16,1 та 17,1 %, відповідно H_2S та ЦГЛ ($p < 0,05$)) (табл. 3.5).

Вплив NaHS та пропаргілгліцину на вміст H_2S та активність цистатіонін- γ -ліази в СОШ щурів ($M \pm m$)

№ з/п	Групи щурів (n=10)	H_2S , нмоль/мг протеїна	ЦГЛ, нмоль/хв. на 1 мг протеїна
1	Контроль	$1,49 \pm 0,05$	$0,140 \pm 0,012$
2	NaHS	$1,68 \pm 0,06^*$	$0,162 \pm 0,012$
3	Пропаргілгліцин	$1,23 \pm 0,04^*$	$0,116 \pm 0,009^*$

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин

Дослідження активності ферменту, який продукує відому вазоактивну речовину – нітроген монооксид в слизовій оболонці шлунка проводили за допомогою методики, що дозволяє оцінити сумарну активність NO-синтаз. Оскільки досліди проведені на інтактних тваринах, без модельного запального процесу, це дозволило нам припустити, що отримані дані свідчать про активність переважно конститутивної (ендотеліальної) NO-синтази. Крім того, ми визначали кількість стабільних метаболітів нітроген монооксиду – нітратів і нітритів (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Вплив різної насиченості організму щурів гідрогенсульфідом на вміст нітритів і нітратів та сумарну активність NO-синтази в СОШ ($M \pm m$)

№ з/п	Групи щурів (n=10)	$NO_2^- + NO_3^-$, нмоль/г тканини	NO-синтаза, пмоль/хв. на 1 мг протеїна
1	Контроль	$1,09 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,11$
2	NaHS	$1,29 \pm 0,03^*$	$1,75 \pm 0,13^*$
3	Пропаргілгліцин	$0,88 \pm 0,02^*$	$1,26 \pm 0,09^*$

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин

Отримані результати доводять, що додаткове введення NaHS тваринам приводило до вірогідного збільшення активності цього фермента на 15,1 %, а кількості нітратів і нітритів – на 18,3 % ($p < 0,05$), тоді як введення ППГ інвертувало вектор вказаних змін (активність NO-синтази була на 17,1 %, а $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ - на 19,3 % меншими, порівняно з контрольною групою тварин).

Захисні властивості СОШ, як відомо, в значній мірі залежать від адекватної мікроциркуляції, яку забезпечують вазодилатуючі простагландини. Пригнічення їх синтезу (шляхом інгібування ЦОГ-1 ЦОГ-2) притаманне багатьом ксенобіотикам, в тому числі і протизапальним засобам стероїдної та нестероїдної будови. Тому для оцінки захисного потенціалу СОШ (головної мішені небажаних ефектів останніх), оцінювали продукцію простагландинів слизовою оболонкою шлунку шляхом визначення сумарної активності простагландин-Н-синтази (PGH-синтази). Враховуючи той факт, що у інтактних тварин (без модельного запального процесу) в слизовій шлунку переважно експресується конституїтивна ізоформа цього ферменту, тому активність PGH-синтази в СОШ оцінювали як умовну ЦОГ-1.

Результати свідчать, що зміни вмісту H_2S в організмі супроводжуються модуляцією рівня PGH-синтази (рис. 3.3). Так, якщо у інтактного контролю її активність становила $3,90 \pm 0,19$ нмоль/хв. на 1мг білка, то на тлі 5-ти денного введення пропаргілгліцину цей показник зменшувався на 15,1% ($p < 0,05$) і становив $3,31 \pm 0,17$ нмоль/хв. на 1мг білка, а на тлі введення донору H_2S – навпаки, вірогідно збільшувався (на 14,3%), що відповідало $4,46 \pm 0,16$ нмоль/хв. на 1мг білка.

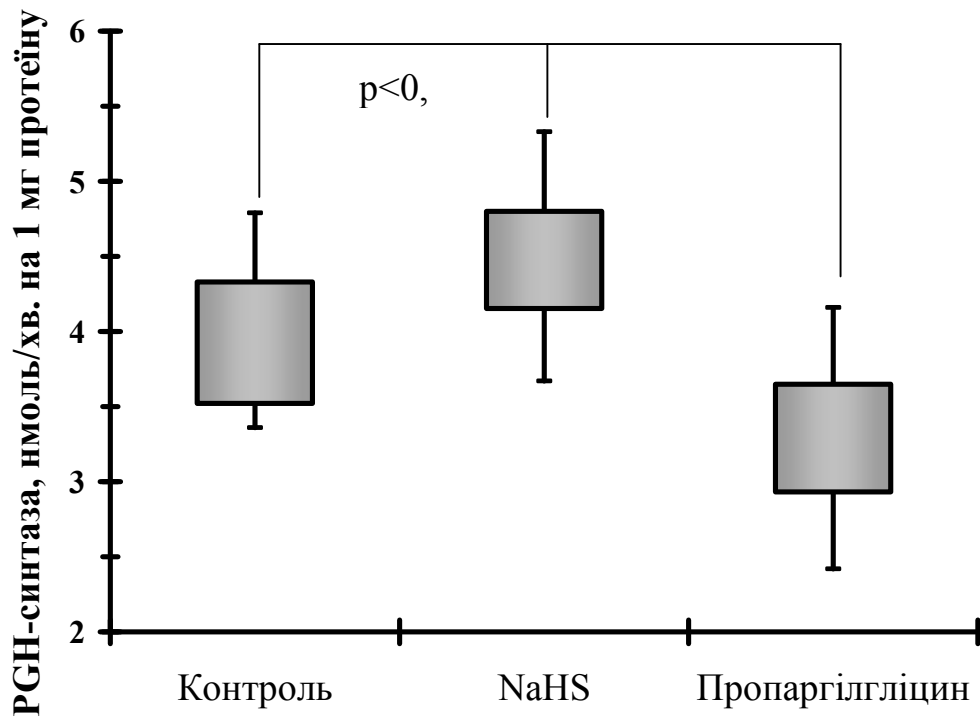


Рис. 3.3. Вплив різної насиченості організму щурів H_2S на активність PGH-синтази. Бокси включають результати з 25 по 75 перцентиль, вертикальні лінії за межами боксів - мінімальний та максимальний результат.

3.4 Дослідження впливу донору H_2S та ППГ на зміни чутливості кільцевих фрагментів мезентеріальних артерій інтактних щурів до дії вазодилататорів

Зміни реактивності мезентеріальних судин до дії відомого вазорелаксанта - H_2S у щурів в досліджах *in vitro* визначали на тлі додаткового введення його донора та інгібітора його синтезу.

Кільцеподібні фрагменти мезентеріальної артерії щурів, яким вводили донор H_2S протягом 5 днів, виявили більшу схильність до H_2S -індукованої релаксації (в діапазоні концентрацій H_2S 10^{-6} - $10^{-2}M$), про що свідчить зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч по відношенню до тварин контрольної групи. В той же час, попереднє введення ППГ зворотно змінювало характер цих змін (зміщення кривої «доза-ефект» праворуч) (рис. 3.4).

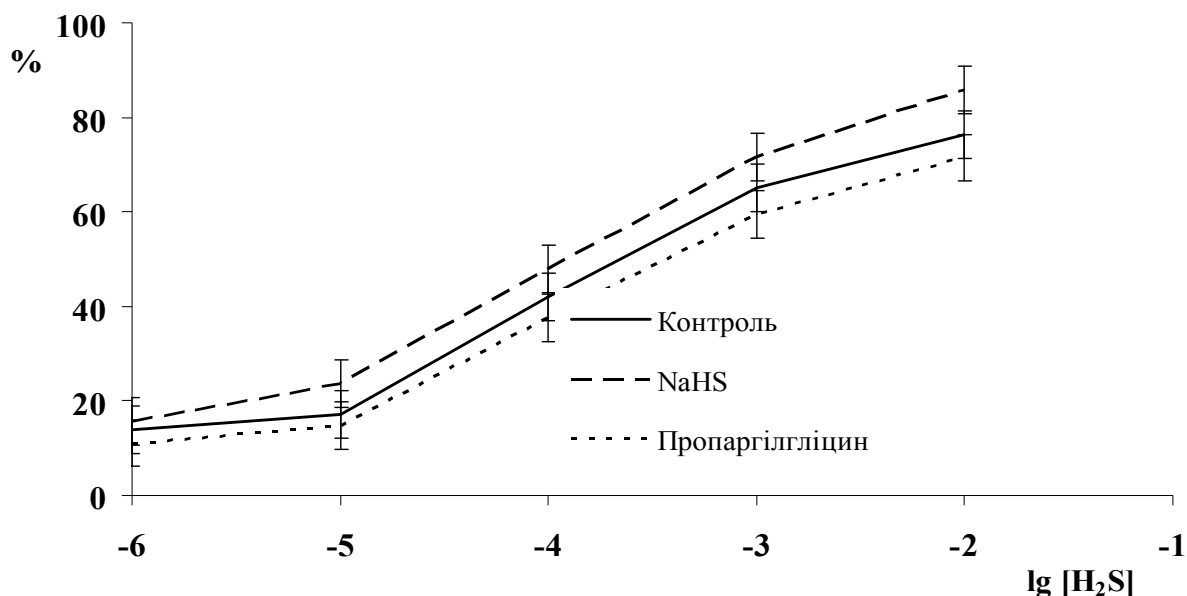


Рис. 3.4 Вплив різної насиченості організму щурів гідрогенсульфідом на дозозалежність H_2S -стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів мезентеріальної артерії щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (M) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом зростаючих концентрацій H_2S .

За 100% прийнятий рівень H_2S -стимульованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин, що по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. Наведені усереднені дані 5 дослідів і значення похибок середнього.

При порівнянні ефективних концентрацій (EC_{50}) H_2S для мезентеріальної артерій у тварин на тлі введення NaHS та ППГ, було встановлено, що цей параметр у щурів з надлишком H_2S на 27,2% вірогідно поступався такому у тварин контрольної групи. Тоді як EC_{50} H_2S за умов попереднього введення ППГ для мезентеріальної артерії була на 19,8% вищою, ніж у щурів контрольної групи. Це свідчить про збільшення чутливості мезентеріальних судин щурів до дії релаксуючих факторів за умов додаткового введення донору H_2S (рис. 3.5).

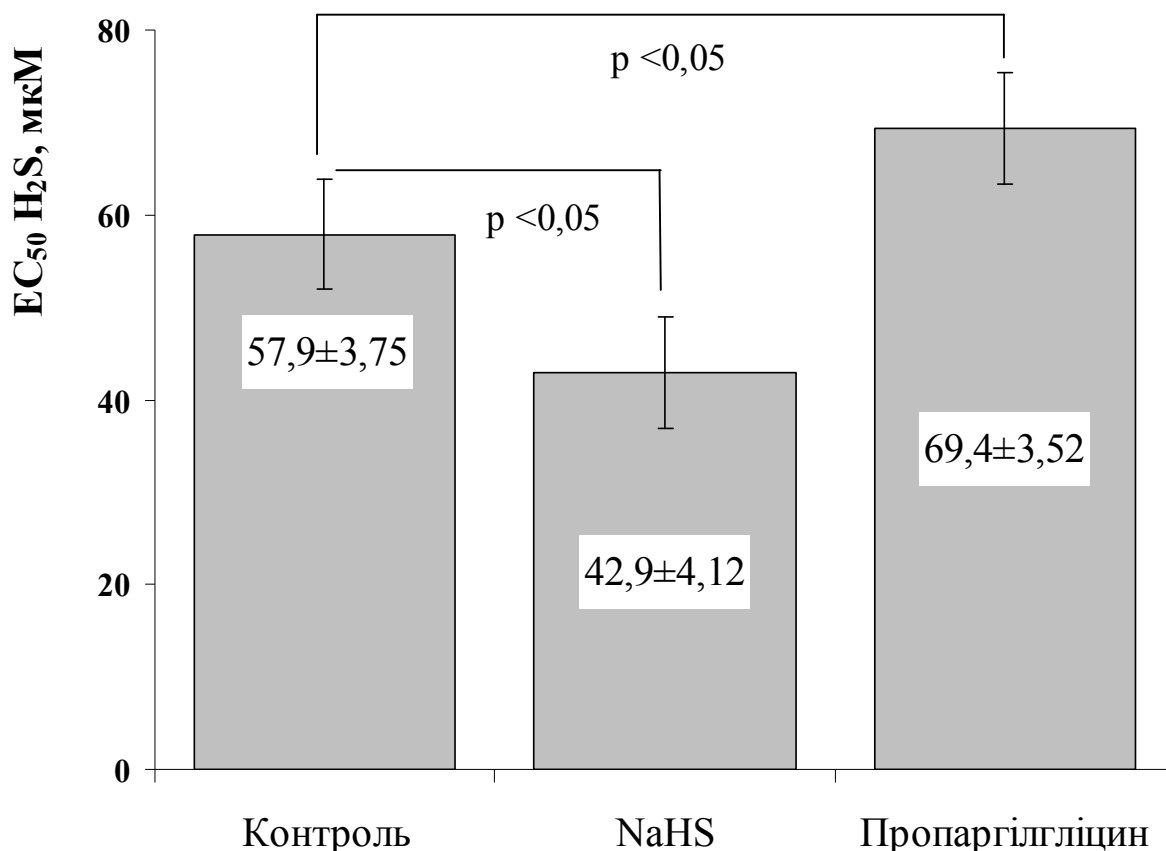


Рис. 3.5 Вплив різної насиченості організму щурів H₂S на EC₅₀ H₂S в мезентеріальній артерії щурів.

3.5 Вивчення впливу донору H₂S на зміни клітинного циклу та процеси апоптозу в тканинах шлунку інтактних щурів

Виявлений вплив різного рівня в організмі H₂S на захисний потенціал СОШ, зокрема, той факт, що саме донору H₂S притаманна спроможність підвищувати опірність шлунку до дії агресивних чинників, показав доцільність дослідження змін показників клітинного циклу та фрагментацію ДНК в клітинах слизової оболонки шлунку у інтактних щурів та оцінки зміни цих показників після введення NaHS в умовно-терапевтичній дозі. Для визначення змін цих показників був використаний метод протокової цитометрії, схема експерименту та досліджувані параметри описані в розділі 2.

Результати досліджень наведені в таблиці 3.6, приклади ДНК-гістограм піддослідних щурів представлені на рис. 3.6 та 3.7. Можна відмітити, що на ДНК-гістограмах перший вищий пік (фаза G0G1) відповідав ядрам клітин СОШ з вмістом ДНК=2с. Відсоток цих ядер клітин слизової оболонки шлунка щурів на тлі введення NaHS становив в середньому $83,3 \pm 2,43$ %, що практично не відрізнялось від показника інтактних щурів (в середньому $81,9 \pm 2,60$ %) (див. табл. 3.6). Другий пік, який віддзеркалює відсоток клітинних подій, які перебувають у фазі G2+M (вміст ДНК=4с), у тварин дослідної групи незначно відрізнявся від контролю і становив в середньому $11,8 \pm 1,26$ проти $10,4 \pm 2,09$ %, відповідно. Між двома цими піками на ДНК-гістограмах проліферуючих клітин присутні об'єкти з вмістом ДНК>2с і <4с, тобто ті, що перебувають у так званій фазі синтезу ДНК (S-фазі). Як свідчать отримані результати, ці показники у тварин обох груп також практично не відрізнялись між собою і становили, відповідно $6,24 \pm 2,02$ та $6,37 \pm 1,16$ %.

Таблиця 3.7

Показники клітинного циклу клітин слизової оболонки шлунка інтактних щурів на тлі введення донору H₂S (M $\pm$ σ)

Групи тварин (n=6)	Показники клітинного циклу						
	SUB-G0G1	G0G1	S	G2+M	IP	BP	CV
Контроль	$5,20 \pm 1,81$	$81,94 \pm 2,60$	$6,24 \pm 2,02$	$11,82 \pm 1,26$	$18,06 \pm 2,60$	$0,53 \pm 0,16$	$5,92 \pm 0,30$
NaHS (1,5 мг/кг в/оч)	$6,58 \pm 1,79$	$83,26 \pm 2,43$	$6,37 \pm 1,16$	$10,37 \pm 2,09$	$16,74 \pm 2,43$	$0,64 \pm 0,18$	$6,65 \pm 0,65$

Примітка: * - позначена статично значуща ($p < 0,05$) різниця із показниками групи контрольної групи тварин

Фрагментація ДНК, як відомо, є однією з обов'язкових складових апоптозу [219]. У дослідженні показник фрагментації ДНК в ядрах клітин СОШ

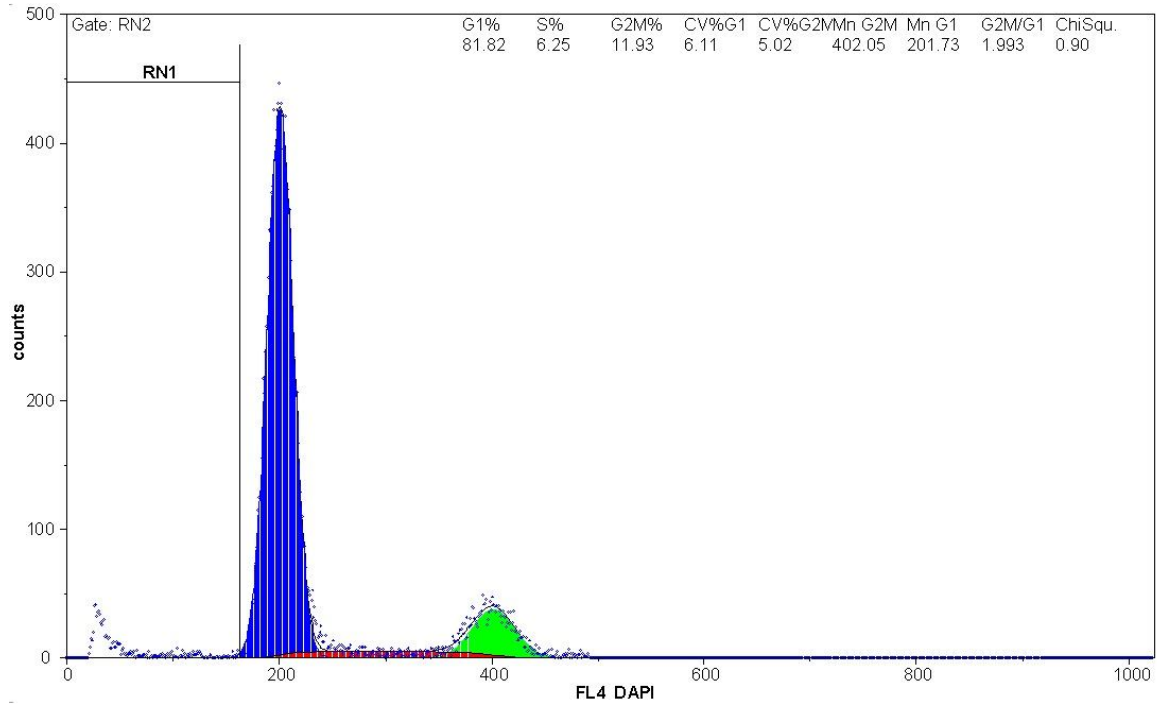


Рис.3.6 ДНК-грама ядерної суспензій клітин слизової оболонки шлунка щура контрольної групи. RN1 – фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 5,50 %. Синтез ДНК (S%) = 6,25%. G2 + M (4c) = 11,93%. CV = 6,11%. Кількість подій 20000.

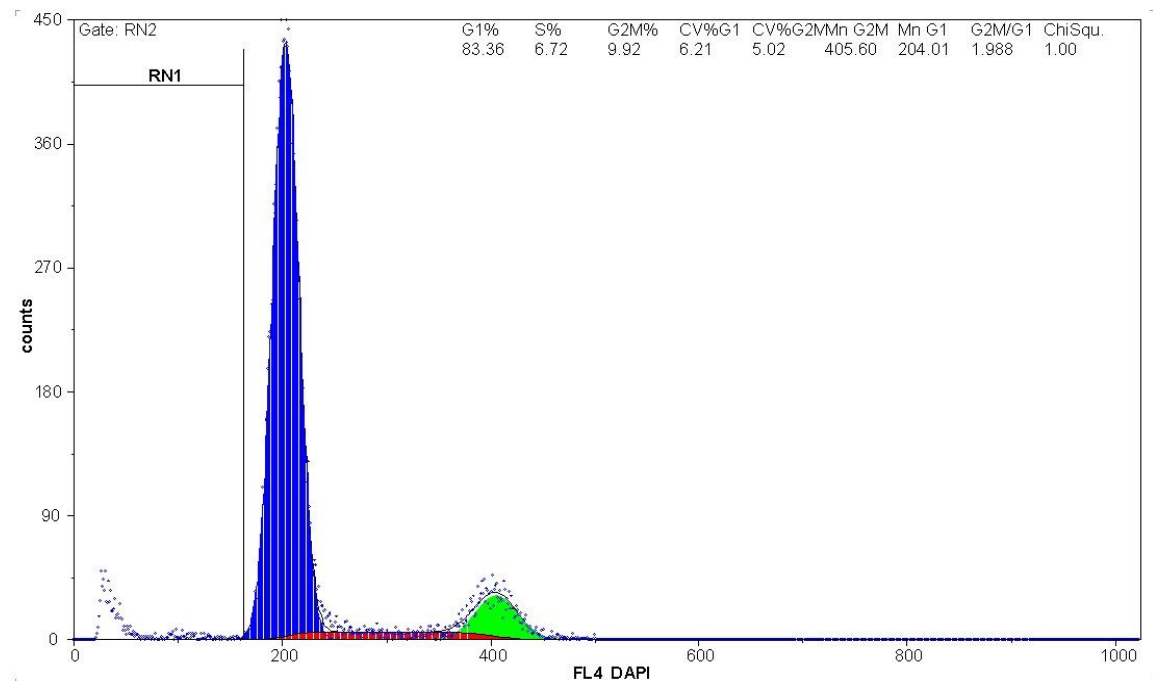


Рис.3.7 ДНК-грама ядерної суспензій клітин слизової оболонки шлунка щура, який отримував донор гідроген сульфід. RN1 – фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 6,07 %. Синтез ДНК (S%) = 6,72%. G2 + M (4c) = 9,92%. CV = 6,21%. Кількість подій 20000.

щурів на тлі введення NaHS становив в середньому $6,58 \pm 1,79$ %, що незначно вище, ніж у контрольних щурів, однак ця різниця не була статистично вірогідною ($p > 0,05$), тому, враховуючи відносно невелику кількість тварин в групі, може бути розцінена як тенденція.

Для оцінки спроможності клітин слизової шлунка до відновлення в аналізі ДНК-гістограм визначали такі показники як індекс проліферації та блок проліферації. В дослідженні було виявлено, що середнє значення індексу проліферації та блоку проліферації клітин СОШ у щурів контрольної групи становили, відповідно, $18,1 \pm 2,60$, та $0,64 \pm 0,18$, а у щурів, яким вводили донор гідроген сульфід - $16,7 \pm 2,43$ та $0,53 \pm 0,16$, відповідно. Як і інші показники клітинного циклу, вони незначно відрізнялись між контрольною та дослідною групами.

Тобто, за даних умов експерименту введення натрію гідроген сульфід у умовнотерапевтичній дозі не викликало суттєвих змін у клітинному циклі слизової оболонки шлунка інтактних щурів. Також не було встановлено статистично значущих відмінностей в числі клітинних подій в фазі G0G1 ($p > 0,05$), S фазі ($p > 0,05$), а також G2+M ($p > 0,05$).

Слід відзначити, що згідно отриманих даних, в групі тварин, яким вводили NaHS, зареєстровано невелике зростання числа подій в інтервалі SUB-G0G1, порівняно з контрольними тваринами, проте це підвищення не сягало статистично вірогідних значень.

Резюме

Різна насиченість організму щурів H_2S не викликає макроскопічних змін СОШ, натомість має виражений вплив на біохімічні показники стану слизової оболонки та H_2S -стимульоване розслаблення мезентеріальних артерій. Так, введення донору H_2S (NaHS) супроводжувалось зменшенням інтенсивності процесів ліпопероксидації та окисної деструкції білків, зростанням антиоксидантного потенціалу, збільшенням ензиматичної продукції простагландинів та нітроген монооксиду, а також підвищенням чутливості стінки мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S . Однак введення NaHS не впливало на показники клітинного циклу та не виявляло впливу на процеси

апоптозу в СОШ.

На противагу цьому, за умов введення ППГ – інгібітору цистатіон-γ-ліази - формувалася дефіцит H_2S в крові, зростала інтенсивність окисної деструкції ліпідів білків, збільшувався прооксидантний потенціал, порушувався фосфоліпідний спектр та проникність клітинних мембран, зменшувалась ензиматична продукція простагландинів, H_2S і NO , а також знижувалась чутливість стінки мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S .

Тобто, зниження вмісту в крові H_2S зменшувало «опірність» шлунку до дії агресивних чинників як екзо-, так і ендogenousного походження, тоді як збільшення рівня цього газотрансміттера – навпаки, проявляло протективну здатність щодо СОШ.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:

1. Таран І. В. Гостра токсичність гідроген сульфідів та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Медична хімія. – 2011. – Т.13. – №4 (49). – С. 88–91.

2. Таран І. В. Вираженість гастротоксичної дії диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфідів в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – №4-5 (40). – С. 17–24.

3. Таран І. В. Вікові зміни продукції гідроген сульфідів слизовою оболонкою шлунка в реалізації гастротоксичності НПЗЗ у щурів. / Н. І. Волощук, І. В. Таран, А. В. Мельник, О. С. Ольховський // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – №5(24). С. 59 (IV Національний з'їзд фармакологів України. Київ, 10-12 жовтня 2011р. : тези доповідей).

4. Таран І. В. Роль гідроген сульфідів в реалізації захисного потенціалу слизової оболонки шлунку / І. В. Таран // Міжнародна наук.-практ. конференція молодих вчених 15 травня 2015 р. : матер. конф. – Вінниця. - 2015. – С. 83.

5. Таран І. В. Вплив донору гідроген сульфідів на зміни клітинного циклу та фрагментацію ДНК на тлі диклофенак-індукованої гастропатії / І. В.

Таран, І. Л. Черешнюк, Н. І. Волощук // Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини : VIII науково-практична конференція з міжнародною участю з клінічної фармакології, 9-10 листопада 2015 р., Вінниця : тези доп. – Вінниця, 2015р. – С. 238-240.

РОЗДІЛ 4

ЗМІНИ ЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКУ У ЩУРІВ З ГАСТРОПАТІЄЮ, ІНДУКОВАНОЇ ДИКЛОФЕНАКОМ НАТРІЮ, ЗА УМОВ РІЗНОГО ВМІСТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗЗ) займають провідне місце в фармакотерапії патологічних процесів, що проявляються больовим синдромом, запаленням та лихоманкою. Безконтрольне використання цих препаратів, збільшення їх доз та тривалості застосування тощо, супроводжується розвитком побічних та небажаних ефектів, серед яких найчастіше зустрічаються гастропатії (ерозії та пептичні виразки шлунку) [4 5, 6, 7, 8].

Вплив НПЗЗ на слизову оболонку шлунку (СОШ) реалізується через різноманітні молекулярні механізми. Препарати цієї групи порушують передепітеліальні фактори захисту СОШ, адже викликають руйнування слизово-бікарбонатно-фосфоліпідного «бар'єру» клітин поверхневого епітелію шлунку. Також НПЗЗ змінюють епітеліальний компонент захисту, який визначається стійкістю поверхні епітеліальних клітин і міжклітинних контактів до зворотної дифузії іонів гідрогену, гідрофобними властивостями слизової оболонки, які сприяють «відштовхуванню» хлороводневої кислоти, а також досить високою здатністю епітеліальних клітин до проліферації. Локальні токсичні ефекти НПЗЗ можуть бути пов'язані з їх здатністю індукувати процеси оксидативного стресу, впливати на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію, знижувати утворення глутатіону, роз'єднувати тканинне дихання та окисне фосфорилювання, посилювати хемотаксис нейтрофілів в слизовій оболонці шлунку [11, 220, 221].

Газова молекула – H_2S , яка є важливим цитопротектором, регулює процеси запалення, апоптозу і виявляє властивості гастропротектора [222, 223]. Залишається до кінця невирішеним питання щодо впливу різного рівня насиченості організму щурів гідроген сульфідом на індуковані НПЗЗ зміни

біохімічних показників СОШ. Тому метою цієї частини дослідження було оцінити зміни пошкоджуючої дії диклофенаку натрію на шлунково-кишковий тракт у щурів на тлі введення донору H_2S ($NaHS$) та інгібітору його синтезу (ППГ), а також з'ясувати деякі молекулярні механізми реалізації цих змін.

4.1 Дослідження макроскопічного стану слизової оболонки шлунку, секреторної та моторно-евакуаторної функції ШКТ на тлі модулювання рівня H_2S за умов диклофенак-індукованої гастропатії

Для оцінки гастротоксичної дії досліджуваного НПЗЗ, піддослідні тварини були розподілені на декілька груп. І група – інтактний контроль (отримували еквівалентні кількості розчинників). Тваринам II групи внутрішньошлунково 5 днів вводили диклофенак натрію, 8 мг/кг на 1% крохмальному гелі. Щурам III та IV груп цей НПЗЗ вводили на тлі попереднього 5-ти денного введення донору H_2S - $NaHS$ та інгібітору його синтезу ППГ, відповідно. В окремій частині дослідів диклофенак натрію у вищезазначеному режимі вводили через 0,5 години після інтрагастрального введення натрію гідроген сульфід (4 мг/кг). Досліджувані речовини вводили в умовно терапевтичних дозах ($1/20 LD_{50}$), запозичених з літератури, або розрахованих попередньо [179, 191]. Евтаназію тварин здійснювали шляхом цервікальної дислокації згідно вимог біоетики. Шлунки вилучали, розрізали за великою кривизною, промивали та проводили візуальне дослідження слизової оболонки шлунку (СОШ): оцінювали наявність здуття шлунку та кишечника, гіперемії, геморагій, набряку, порушень складчастості останньої. Крім того, підраховували кількість виразок на одну тварину, важкість ураження та розраховували виразковий індекс (ВІ) за формулою [192]. Визначення стану секреторної функції шлунку проводили титриметричним методом [179]. Вивчення евакуаторної функції шлунку та моторної функції кишечника визнали за допомогою методу «міток» [179].

Результати засвідчили, що внутрішньошлункове введення диклофенаку натрію викликало вірогідне зменшення вмісту H_2S в сироватці крові (на 18,4 %)

(рис. 4.1, табл. 4.1). На тлі попереднього введення ППГ депривація рівня H_2S була більш виразною (на 38,9 та 25,2% порівняно з контролем та диклофенаком, відповідно, ($p<0,05$)). Натомість NaHS – навпаки, нівелював зазначені зміни рівня H_2S , і повертав його вміст в сироватці крові практично до рівня інтактних тварин (рис. 4.1, табл. 4.1).

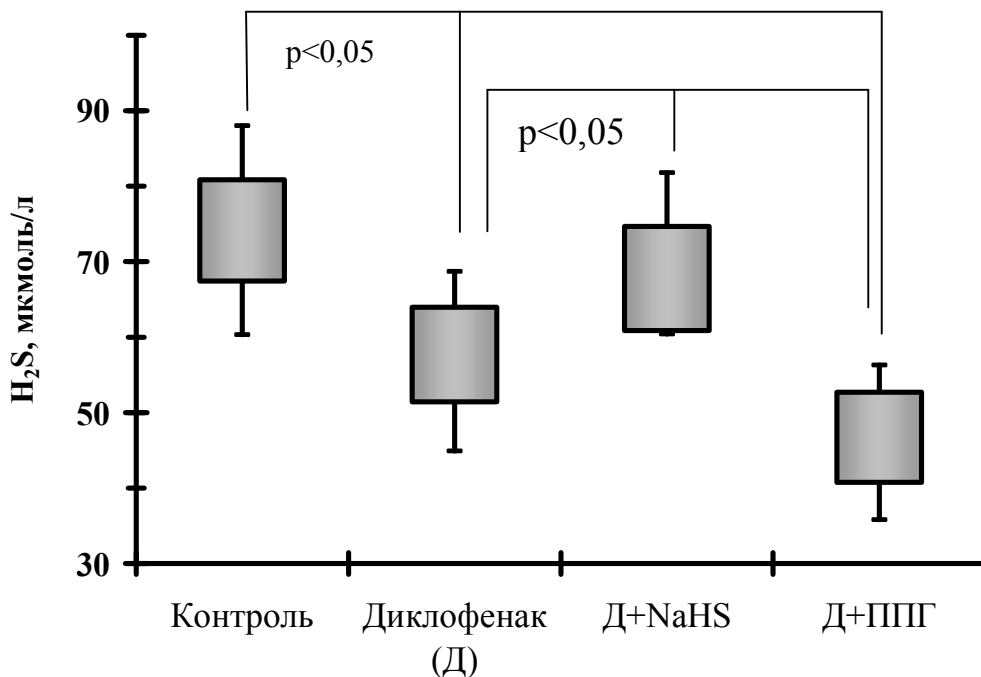


Рис. 4.1 Вплив NaHS та ППГ на індуковані диклофенаком (Д) зміни вмісту H_2S в сироватці крові щурів. Бокси включають результати з 25 по 75 перцентиль, вертикальні лінії за межами боксів - мінімальний та максимальний результат.

На тлі введення диклофенаку натрію у щурів спостерігались виразні макро- та мікроскопічні дефекти СОШ у вигляді виразок, ерозій та багатьох крововиливів, що супроводжувалися у більшості тварин здуттям шлунку, набряком з вираженою гіперемією, формуванням ділянок некрозу, порушенням складчастості, при макроскопічному дослідженні були знайдені у 100 % тварин. Тварини були практично нерухливі порівняно з інтактним контролем, насторожені, мали негативний «харчовий» рефлекс (табл. 4.2). Одна тварина в цій групі загинула внаслідок перфорації виразки. Зменшення вмісту H_2S , індуковане ППГ, значно погіршувало макроскопічну картину за умов введення

диклофенаку: спостерігалось утворення у СОШ значних за розміром виразок, які відрізнялися за формою, глибиною, а також супроводжувалися іншими порушеннями СОШ: гіперемією, набряком, крапковими крововиливами, виразки були знайдені у 100 % тварин, перфорація і загибель спостерігались у 2 тварин з групи. При цьому інші щури цієї групи мали «негативний» харчовий рефлекс, лежали у клітках в нефізіологічній позі, були нерухливі, не пили воду.

Таблиця 4.1

Прояви гастротоксичності диклофенаку натрію за умов введення NaHS та ППГ у щурів ($M \pm m$, $n = 10$)

№ групи	Умови досліджу	Вміст H_2S в сироватці крові, мкмоль/л	Показники гастротоксичності		
			К-сть виразок на 1 тварину	Важкість	Виразковий індекс
I	Контроль ($n = 10$)	$79,8 \pm 2,37$	0	0	0
II	Диклофенак натрію ($n = 10$)	$65,1 \pm 6,66\#$	$12,7 \pm 0,61$	$1,30 \pm 0,09$	$2,8 \pm 0,33^*$
III	Диклофенак натрію + NaHS ($n = 10$)	$86,9 \pm 5,34^*$	$5,9 \pm 0,59^*$	$1,00 \pm 0,12^*$	$1,53 \pm 0,19^*$
IV	Диклофенак натрію + ППГ ($n = 10$)	$48,7 \pm 3,37^*\#$	$21,7 \pm 2,33^*$	$1,70 \pm 0,20$	$4,50 \pm 0,17^*$

Примітки:

1. # - статистично значущі відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю;
2. * - статистично значущі відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку

Попереднє введення NaHS привело до значного пригнічення перебігу диклофенак-індукованої гастротоксичності та покращення загального стану щурів і зовнішнього вигляду їх СОШ. У цій групі щурів гіперемії та порушення складчастості СОШ не спостерігалось, а наявність геморагій, здуття та набряку слизової достовірно зменшилися у даній групі у порівнянні з монотерапією диклофенаком. Забелі тварин не зареєстровано.

Крім того, щурів з низьким рівнем H_2S в сироватці крові (група IV) ульцерогенні прояви диклофенаку натрію проявлялись значно сильніше, ніж у

тварин II групи: показники множинності, важкості виразкоутворення були на 70,8 та 30,8 % більшими, ніж в групі II, а виразковий індекс перевищував аналогічний показник групи порівняння в 1,6 рази. В групі III, де диклофенак натрію вводили на тлі підвищеного рівня H_2S – навпаки, показники ураження СОШ були вірогідно меншими: множинність і важкість ураження - на 53,5, 23,1 % менше, а виразковий індекс – в 1,8 рази меншим, ніж в групі II (табл. 4.1).

Таблиця 4.2

Вплив різного рівня насиченості організму H_2S на макроскопічні показники СОШ на тлі введення диклофенаку натрію Me (LQ; UQ)

Експериментальні групи, (n=10)	Інтактний контроль	Диклофенак натрію	Диклофенак натрію + пропаргил гліцин	Диклофенак натрію + натрію гідроген сульфід
Здуття, бали	0 (0; 0)	2 (2; 3)*	3 (2; 3)*	1,5 (1; 2)
Геморагії, бали	0 (0; 0)	2,5 (2; 3)*	3 (2; 3)*	1 (0; 1)*#
Гіперемія, бали	0 (0; 0)	2 (2; 3)*	2,5 (2; 3)*	0*#
Набряк, бали	0 (0; 0)	2 (2; 3)*	2,5 (2; 3)*	1 (1; 2)
Порушення складчастості, бали	0 (0; 0)	1 (0; 1)	3 (2; 3)*	0*#

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;

2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували лише диклофенак.

Тобто, результати засвідчили, що рівень H_2S в організмі суттєво впливає на виразність ульцерогенної дії диклофенаку натрію за макроскопічними змінами СОШ. При цьому створення надлишку H_2S шляхом 5-денного внутрішньочеревного введення його донору – $NaHS$ - зменшувало, тоді як

введення специфічного інгібітора його синтезу – ППГ – навпаки, збільшувало виразність гастротоксичної дії досліджуваного НПЗЗ.

Отримані результати спонукали до перевірки можливої гастропротективної дії H_2S за інших умов, а саме – при інтрагастральному його введенні разом з диклофенаком натрію. Результати цього експерименту представлені в таблиці 4.3. Виявилось, що донор H_2S сульфід при внутрішньошлунковому введенні статистично вірогідно зменшував прояви ушкоджуючого впливу диклофенаку на СОШ. Так, множинність і важкість виразкування зменшувались на 47,5 та 28,5 %, відповідно а показник виразкового індексу ставав меншим в 1,5 рази порівняно з монотерапією НПЗЗ.

Таблиця 4.3

Прояви гастротоксичності диклофенаку натрію, NaHS та їх комбінації за умов внутрішньошлункового введення у щурів ($M \pm m$, $n = 10$)

№ групи (n=10)	Умови досліджу	Показники гастротоксичності		
		К-сть виразок на 1 тварину	Важкість	Виразковий індекс
I	Контроль	0	0	0
II	Диклофенак натрію (8 мг/кг в/шл)	$14,5 \pm 1,38$	$1,4 \pm 0,08$	$3,40 \pm 0,31$
III	NaHS (4 мг/кг в/шл)	$0,1 \pm 0,10^*$	$0,1 \pm 0,10^*$	$0,01 \pm 0,01^*$
IV	Диклофенак натрію (8 мг/кг в/шл) + NaHS (4 мг/кг в/шл)	$7,6 \pm 1,08^*$	$1,0 \pm 0,12^*$	$1,90 \pm 0,25^*$

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку

При вивченні фармакологічних речовин, які можуть виявляти противиразкову дію, необхідним є вивчення впливу на секреторну та рухову активність травного каналу [179]. Тому на наступному етапі було визначено, як будуть змінюватись ці показники під впливом досліджуваних сполук та їх комбінацій. Результати дослідження зміни кислотоутворюючої функції шлунку

приведені в табл. 4.4. Не було виявлено вірогідних змін загального об'єму шлункового соку в жодній з груп тварин. Аналізуючи зміни загальної кислотності шлункового соку, можна відмітити, що 5-ти денне інтрагастральне введення донору гідроген сульфід у проявило тенденцію до зниження загальної кислотності (на 11,1 %), що узгоджується з даними літератури, які свідчать про дозозалежний характер антисекреторної дії H_2S через зниження виділення соляної кислоти, і одночасно, антацидну активність внаслідок збільшення продукції бікарбонатів [134, 224]. Натомість диклофенак натрій – навпаки, незначно підвищував загальну кислотність шлункового соку, очевидно, внаслідок свого «кислотного» походження ($pH=4,0$) та парасимпатикоміметичної дії на ШКТ [225]. Комбіноване застосування диклофенаку натрію та $NaHS$ практично не впливають на кислотність секрету шлунку (цей показник відрізняється від контролю на 6,9 %).

Таблиця 4.4

Вплив диклофенаку натрію, $NaHS$ та їх комбінації за умов внутрішньошлункового введення на секреторну функцію шлунку у щурів ($M \pm m$)

Експериментальні групи (n = 10)	Секреція шлунк. соку, мл/100г маси тварини	Загальна кислотність, мл 0,1н $NaOH/100$ мл шлунк. соку
Контроль	$2,0 \pm 0,18$	$127,2 \pm 14,7$
Диклофенак натрію	$2,18 \pm 0,15$	$142,4 \pm 15,$
$NaHS$	$2,26 \pm 0,14$	$113,1 \pm 6,90$
Диклофенак натрію + $NaHS$	$2,13 \pm 0,11$	$135,1 \pm 6,74$

Примітка. * – статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю.

Дослідження змін моторно-евакуаторної функції травного каналу (табл. 4.5) показало, що диклофенаку натрію притаманна здатність статистично вірогідно

збільшувати моторику ШКТ (на 14,9 %) порівняно з контролем. Така дія диклофенаку співставляється з клінічно підтвердженим діарейним синдромом при лікуванні НПЗЗ та є одним з симптомів НПЗЗ-ентеропатії вочевидь, за рахунок стимуляції парасимпатичної нервової системи та активації М-холінорецепторів, що призводить до підвищення моторики та секреції ШКТ. На противагу цьому, NaHS, який окремо вводили щурам – навпаки, викликав (на 25,7 %) зниження моторики кишечника піддослідних тварин. В літературі також описана пряма дозозалежна міорелаксуюча дія H_2S на рухову активність кишечника, а саме – інгібування пропульсивну активність та підвищує амплітуду перистальтичних хвиль. Інгібуючий ефект на пропульсивну активність реалізується за рахунок гіперполяризації гладком'язевих клітин та пригнічення відповіді на холінергічні стимули з ЦНС. Механізми, що залучені у цей релаксуючий ефект до кінця не з'ясовані і можуть включати: активацію фосфатази легких ланцюгів міозину, АТФ-чутливих кальцій-активуємих калієвих каналів низької провідності, а також активацію натрієвих каналів [154].

Таблиця 4.5

Вплив диклофенаку натрію натрію гідрогенсульфіду та їх комбінації за умов внутрішньошлункового введення на моторно-евакуаторну функцію ШКТ у щурів ($M \pm m$)

Експериментальні групи, (n=10)	Загальна довжина кишечнику, см	Довжина кишечника, пройдена контрастною речовиною	
		абс. (см)	%
Контроль	125,1 ± 5,34	79,8 ± 3,59	64,8 ± 4,09
Диклофенак натрію (8 мг/кг)	123,7 ± 3,99	91,7 ± 2,19*	74,4 ± 2,03*
NaHS (4 мг/кг)	126,3 ± 7,43	59,3 ± 5,24*#	47,6 ± 4,97*#
Диклофенак натрію+ NaHS	125,6 ± 2,16	75,3 ± 3,40#	60,1 ± 2,70#

Примітки:

1. * – статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку

Встановлено, що одночасне 5-ти денне введення щурам NaHS та диклофенаку в умовно терапевтичних дозах практично нівелювало зміни моторної функції кишечника тварин, які виникали під впливом монотерапії досліджуваними сполуками: довжина кишечника, пройдена контрастною речовиною в цій групі тварин, практично не відрізнялась від групи контролю.

4.2 Оцінка впливу надлишку та дефіциту гідроген сульфідіду на зміни біохімічних маркерів стану слизової оболонки шлунку на тлі введення диклофенаку натрію

Отримані дані доводять виразну гастропротективну дію H_2S за умов диклофенак-індукованого ураження СОШ. Для з'ясування біохімічних механізмів, що лежать в основі цього впливу, була проведена наступна серія дослідів, де оцінювали ступінь порушень біохімічних показників слизової шлунку, індуковані досліджуваним НПЗЗ на тлі введення NaHS та ППГ.

Встановлено, що введення диклофенаку натрію супроводжувалось активацією вільнорадикального окиснення ліпідів та білків (табл. 4.6), про що доказово свідчить достовірне зростання вмісту МДА (на 23,3 %) та КГП (на 20,7 %). Різний рівень гідроген сульфідіду в організмі змінює виразність активуючого впливу НПЗЗ на процеси окисної модифікації ліпідів та протеїнів. Встановлено, що застосування диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S значно збільшувало ступінь вільнорадикального окиснення: рівень МДА та КГП в СОШ достовірно (на 42,4 та 40,1 %, відповідно) перевищував показники у контрольній групі. Натомість введення диклофенаку натрію з екзогенним донором H_2S нормалізувало процеси перекисного окиснення ліпідів та білків: вміст МДА та КГП в СОШ статистично вірогідно не відрізнявся від такого у контрольній групі тварин.

Вплив диклофенаку натрію на вміст продуктів пероксидації ліпідів та білків в СОШ за умов різної насиченості організму щурів H_2S ($M \pm m$)

Групи щурів (n=10)	МДА, нмоль/мг протеїна	КГП, нмоль/мг протеїна
Контроль	6,62±0,27	2,32±0,09
Диклофенак (Д)	8,16±0,29*	2,80±0,10*
Д+NaHS	6,82±0,31#	2,42±0,12#
Д+Пропаргілглїцин	9,43±0,33*#	3,25±0,13*#

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували лише диклофенак.

Використання НПЗЗ супроводжувалось формуванням дисбалансу в системі про/антиоксидантів (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Вплив диклофенаку натрію на стан про- та антиоксидантної системи СОШ за умов різної насиченості організму щурів H_2S ($M \pm m$)

Групи щурів (n=10)	НАДФН-оксидаза, нмоль/хв. на 1 мг протеїна	СОД, ум.од./мг протеїна
Контроль	1,07±0,06	1,82±0,06
Диклофенак (Д)	1,29±0,08*	1,50±0,04*
Д+NaHS	1,09±0,05#	1,75±0,06#
Д+Пропаргілглїцин	1,56±0,07*#	1,24±0,07*#

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували лише диклофенак.

На тлі введення диклофенаку натрію реєструвалось достовірне зростання активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази (на 20,6 %) та зниження активності антиоксидантного ензиму СОД (на 17,6 %) в СОШ, порівняно з контролем. Застосування цього НПЗЗ на тлі дефіциту H_2S значно збільшувало масштабність пертурбацій в системі про-антиоксидантних ензимів: за цих умов виявлялось вірогідне збільшення (на 45,8 %) активності НАДФН-оксидази та зниження (на 31,9 %) активності СОД. За умов введення диклофенаку натрію та донору H_2S активність НАДФН-оксидази та супероксиддисмутази статистично достовірно не відрізнялась від таких показників у контрольній групі тварин.

Далі було оцінено зміни фосфоліпідного спектру СОШ за умов введення диклофенаку натрію на тлі різної насиченості організму щурів H_2S (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Вплив диклофенаку натрію на фосфоліпідний спектр СОШ за умов різної насиченості організму щурів H_2S ($M \pm m$)

Фосфоліпіди, мкг/мг протеїна	Групи тварин (n=10)			
	Контроль	Диклофенак	Д+NaHS	Д+ППГ
Загальні ФЛ	250±6,58	202±6,43*	239±6,01#	174±5,37*#
ФХ	113±5,75	84,4±5,06*	104±5,01#	68,9±4,34*#
ФЕ	60,5±4,21	73,8±3,68*	61,8±3,75#	87,8±3,91*#
ФХ/ФЕ	1,93±0,13	1,18±6,43*	1,77±0,17#	0,81±0,08*#
ЛФХ	16,9±1,12	21,0±1,14*	17,4±1,18#	25,1±1,21*#
ФХ/ЛФХ	6,81±0,32	4,19±0,42*	6,37±0,68#	2,85±0,29*#

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували лише диклофенак.

Встановлено, що введення НПЗЗ супроводжується зменшенням вмісту загальних фосфоліпідів (ЗФ на 19,2 %), фосфатидилхоліну (ФХ на 25,3 %), зростанням рівня фосфатидилетаноламіну (ФЕ на 21,9 %) та лізофосфатидилхоліну (ЛФХ на 24,2 %), а також зменшенням співвідношення ФХ/ФЕ (на 38,8 %) і ФХ/ЛФХ (38,5 %). За умов застосування диклофенаку натрію та ППГ відмічались більш масштабні зміни у фосфоліпідному спектрі: зниження вмісту ЗФ, ФХ, ФХ/ФЕ та ФХ/ЛФХ становило 30,4; 39,0; 58,0 та 58,1 %, зростання рівнів ФЕ та ЛФХ становило відповідно 45,1 та 48,5 %. Натомість введення НПЗЗ сумісно з донором H_2S практично не виявляв впливу на стан фосфоліпідів в мембранах клітин СОШ: фосфоліпідний спектр статистично вірогідно не відрізнявся від показників у контрольній групі тварин.

Диклофенак натрію впливав на слизовий бар'єр СОШ, про що доказово свідчить вірогідне зниження в СОШ вмісту ГАГ на 22,5%, порівняно з контрольною групою тварин (рис. 4.2). Вплив цього НПЗЗ на утворення слизу досить тісно пов'язаний з рівнем H_2S в організмі щурів. За умов введення диклофенаку натрію разом з ППГ падіння рівня ГАГ було більш виразним і становило 35,4 %, відносно показника контрольної групи тварин, та виявилось на 16,6%, більшим порівняно з показником в групі щурів, які отримували лише диклофенак натрію. Застосування цього НПЗЗ сумісно з $NaHS$ не викликало достовірних змін продукції слизу.

Проведені дослідження підтвердили деякі молекулярні механізми, через які реалізується гастротоксичний вплив НПЗЗ. Показано, що токсична дія диклофенаку на шлунок супроводжувалась активацією окисної модифікації ліпідів та протеїнів, формуванням дисбалансу в системі вазодилататори/вазоконстриктори, окисним пошкодженням фосфоліпідів мембран, порушенням метилування фосфоліпідів, а також зниженням продукції глікозаміногліканів слизу. Модулювання вмісту H_2S в значній мірі впливало на гастротоксичний потенціал НПЗЗ. Виявилось, що застосування диклофенаку на тлі дефіциту H_2S значно потенціювало негативний вплив цього НПЗЗ на процеси пероксидації ліпідів та білків, продукцію слизу та фосфоліпідний спектр мембран клітин СОШ. Водночас, введення диклофенаку натрію разом з

донором H_2S більшою мірою нівелювало негативний вплив НПЗЗ на біохімічні процеси в СОШ.

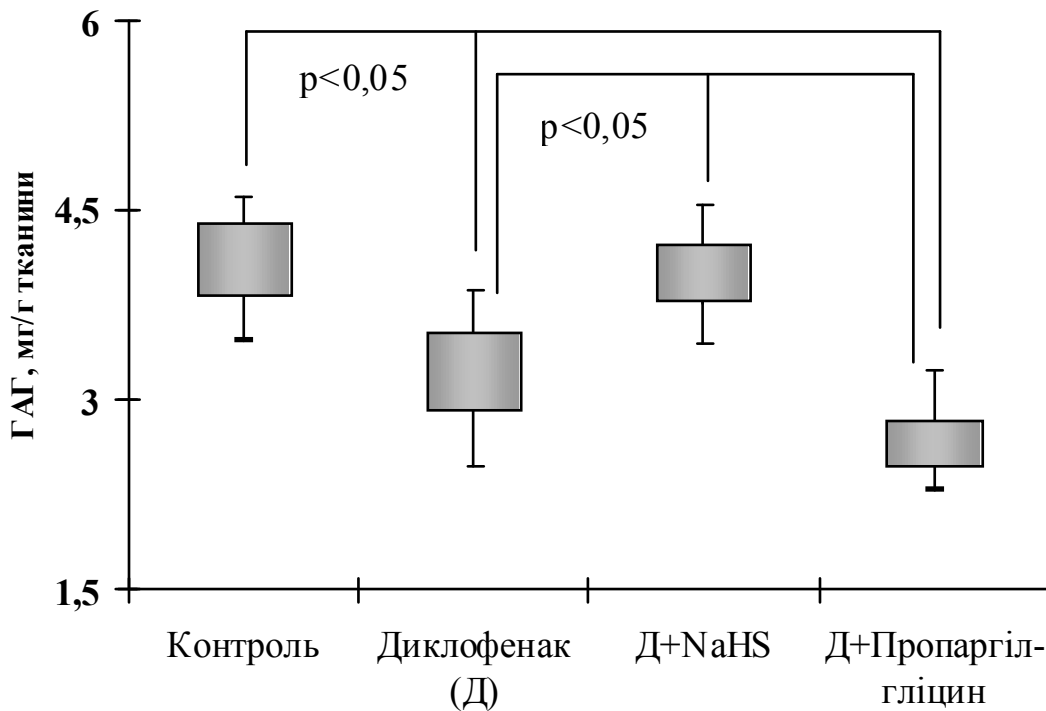


Рис. 4.2 Вплив диклофенаку натрію на вміст глікозаміногліканів (ГАГ) за умов різної насиченості організму щурів гідроген сульфідом. Бокси включають результати з 25 по 75 перцентиль, вертикальні лінії за межами боксів - мінімальний та максимальний результат.

Отже, диклофенак натрію викликав зростання вмісту продуктів пероксидації ліпідів та білків (на 21-23%), дисбаланс в системі про-антиоксидантів (зростала активність НАДФН-оксидази на 21 % та зменшувалась активність СОД на 17,6 %), порушення фосфоліпідного спектру (зростав вміст окиснених форм фосфоліпідів - лізофосфатидилхоліну на 24,3%) та зменшення рівня ГАГ (на 22,5 %).

Ведення диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S (індукованого пропаргілгліцином) супроводжувалось посиленням негативного впливу на процеси пероксидації ліпідів та білків, балансу в системі про-антиоксиданти, показників фосфоліпідного спектру та продукцію глікозаміногліканів слизу,

тоді як створення надлишку H_2S запобігало негативній дії диклофенаку натрію на захисний потенціал шлунку та стан клітинних мембран, оскільки досліджувані показники достовірно не відрізнялись від параметрів контрольної групи.

4.3 Дослідження впливу донору H_2S та ППГ на індуковані диклофенаком зміни продукції вазоактивних медіаторів (H_2S , простагландинів, нітроген монооксиду) у шлунку щурів

Введення НПЗЗ чинить депримуєчий вплив на активність ключового фермента, який залучений до реалізації фармакологічних ефектів та небажаних реакцій, які супроводжують використання НПЗЗ - простагландинсинтетази (рис. 4.3). За відсутності запального процесу у тварин сумарну активність цього ферменту вважали як умовну ЦОГ-1.

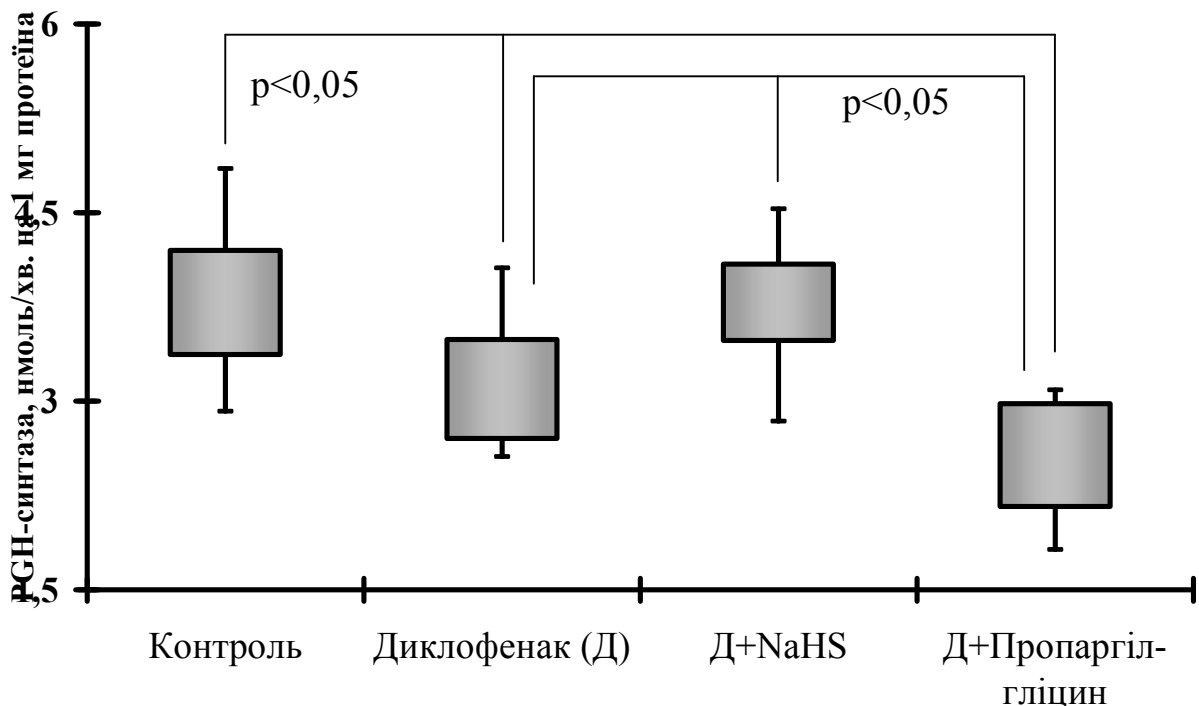


Рис. 4.3. Вплив диклофенаку натрію на активність PGH-синтази за умов різної насиченості організму щурів гідроген сульфідом. Бокси включають результати з 25 по 75 перцентиль, вертикальні лінії за межами боксів - мінімальний та максимальний результат.

Отримані дані засвідчили, що введення щурам диклофенаку натрію призводило до зменшення активності простагландин-Н-синтетази на 16,9 % в порівнянні з контролем.

Додаткове введення NaHS практично не змінювало активність цього ензиму порівняно з контрольними щурами. Застосування диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S , індукованого ППГ, супроводжувалось більш виразним падінням активності простагландин-Н-синтетази: активність цього ензиму була на 33,8% меншою, ніж в контролі, та на 20,3%, порівняно з ізольованим введенням диклофенаком.

Ще однією молекулою, яка бере участь в регуляції тону мезентеріальних судин, є нітроген монооксид, тому далі ми оцінили сумарну активність NO-синтази та загальний вміст нітратів і нітритів в СОШ за умов введення НПЗЗ на тлі різного рівня H_2S в організмі (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Вплив диклофенаку натрію на вміст нітритів і нітратів та сумарну активність NO-синтази в СОШ за умов різної насиченості організму щурів H_2S ($M \pm m$)

№ з/п	Групи щурів (n=10)	$NO_2^- + NO_3^-$, нмоль/г тканини	NO-синтаза, пмоль/хв. на 1 мг протеїна
1	Контроль	$1,07 \pm 0,04$	$1,55 \pm 0,11$
2	Диклофенак (Д)	$0,85 \pm 0,03^*$	$1,18 \pm 0,09^*$
2	Д+NaHS	$1,01 \pm 0,05^\#$	$1,50 \pm 0,08^\#$
3	Д+Пропаргілгліцин	$0,70 \pm 0,02^{*\#}$	$0,92 \pm 0,05^{*\#}$

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували лише диклофенак.

Дослідження показали, що застосування диклофенаку натрію супроводжується достовірним зменшенням сумарної активності NO-синтази та вмісту $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в СОШ на 23,9 та 20,7 % відповідно, що співставляється з даними літератури [121]. Натомість сумісне введення донору H_2S та НПЗЗ наближало досліджувані показники системи NO-синтаза/NO до рівня контрольної групи тварин. Створення дефіциту H_2S за допомогою ППГ суттєво потенціювало інгібуючий вплив диклофенаку на сумарну активність NO-синтази: за цих умов її активність була на 40,6 % меншою, порівняно з контролем.

Подібна тенденція була відмічена при дослідженні продукції H_2S в СОШ (табл. 4.10). Так, в групі тварин, які отримували диклофенак натрію відмічається достовірне зменшення активності H_2S -продукуючого ензиму ЦГЛ та вмісту H_2S відповідно на 23,6 та 21,7 %, порівняно з контролем.

Таблиця 4.10

Вплив NaHS та пропаргілгліцину на індуковані диклофенаком натрію зміни вмісту H_2S та активності цистатіонін- γ -ліази в СОШ ($M \pm m$)

№ з/п	Групи щурів (n=10)	H_2S , нмоль/мг протеїна	ЦГЛ, нмоль/хв. на 1 мг протеїна
1	Контроль	$1,52 \pm 0,04$	$0,144 \pm 0,012$
2	Диклофенак (Д)	$1,19 \pm 0,06^*$	$0,110 \pm 0,009^*$
2	Д+NaHS	$1,46 \pm 0,07^\#$	$0,133 \pm 0,004^\#$
3	Д+Пропаргілгліцин	$1,01 \pm 0,03^{* \#}$	$0,085 \pm 0,003^{* \#}$

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували лише диклофенак.

Призначення диклофенаку натрію на тлі застосування NaHS достовірно

не впливало на продукцію H_2S (цей показник вірогідно не відрізнявся від аналогічного параметру контрольної групи тварин).

В той же час використання цього нестероїдного антифлогістика разом з ППГ збільшувало масштабність змін синтезу H_2S в СОШ: активність ЦГЛ та рівень H_2S були відповідно на 20,9 та 22,7 % меншими, ніж в групі тварин, які отримували лише диклофенак.

4.4 Дослідження впливу донору H_2S та ППГ на індуковані диклофенаком зміни чутливості кільцевих фрагментів мезентеріальних артерій до дії вазодилататорів

Застосування диклофенаку натрію викликало зменшення чутливості мезентеріальних артерій до дії H_2S (рис. 4.4, 4.5).

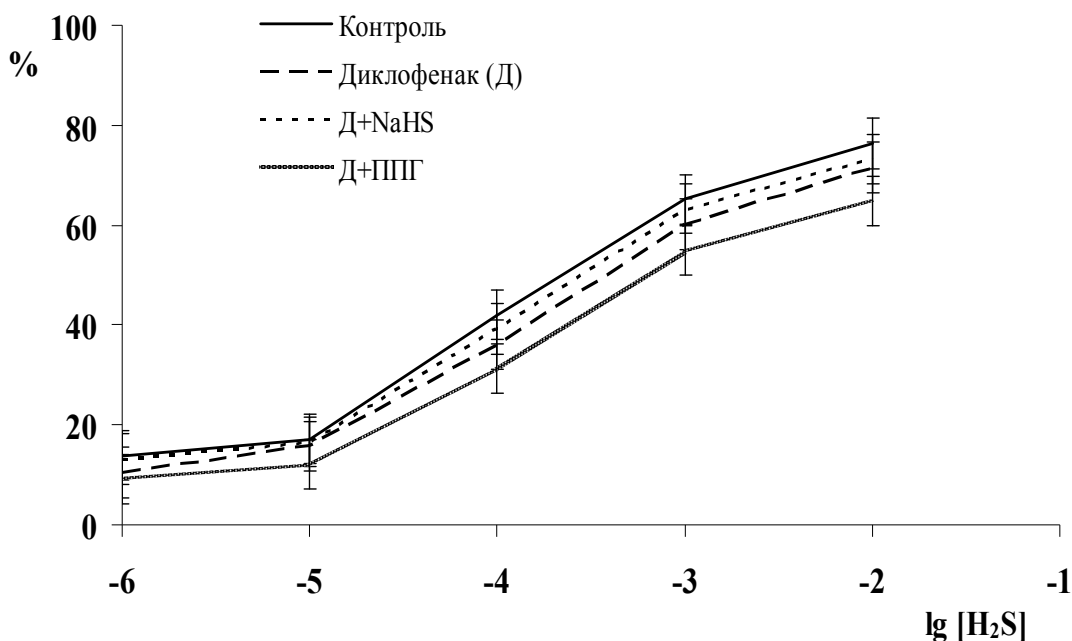


Рис. 4.4. Вплив різної насиченості організму щурів гідроген сульфідом на індуковані диклофенаком натрію зміни H_2S -стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів мезентеріальної артерії щурів. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом зростаючих концентрацій H_2S .

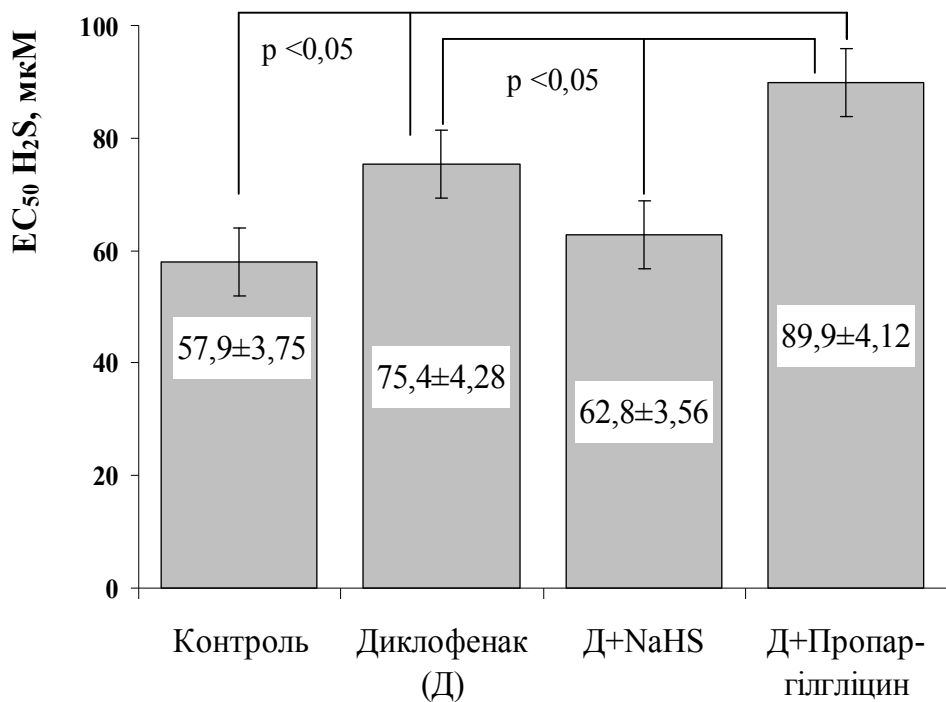


Рис. 4.5 Вплив різної насиченості організму щурів H₂S на індуковані диклофенаком натрію зміни EC₅₀ H₂S в мезентеріальній артерії щурів

За вказаних умов H₂S в діапазоні концентрацій 10⁻⁶-10⁻²М викликав менш виразну вазорелаксацію, ніж в контролі; відмічалось зміщення кривої «доза-ефект» праворуч та достовірно (на 27,5 %) підвищувалась EC₅₀ (H₂S). Сумісне застосування диклофенаку натрію разом з донором H₂S практично повністю відновлювало чутливість мезентеріальних судин до вазорелаксуючої дії H₂S: крива «доза-ефект» зміщувалась ліворуч відносно такої в групі тварин, які отримували лише НПЗЗ; показник EC₅₀ (H₂S) достовірно не відрізнявся від контролю. Натомість введення ППГ разом з диклофенаком призводило до більш виразного зменшення H₂S-індукованої вазорелаксації: крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч відносно такої в групі тварин, які отримували лише НПЗЗ; показник EC₅₀ (H₂S) був достовірно більшим, ніж за умов ізолюваного введення диклофенаку.

За 100% прийнятий рівень H₂S-стимульованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин, який по амплітуді відповідає

максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. Наведені усереднені дані 5 дослідів і значення похибок середнього.

Таким чином, введення диклофенаку натрію супроводжувалось зменшенням продукції вазодилататорів - простагландинів, нітроген монооксиду, гідроген сульфідів та зниженням чутливості стінки мезентеріальної артерії до дії H_2S . Застосування цього НПЗЗ на тлі надлишку гідроген сульфідів, індукованого екзогенним введенням $NaHS$, зменшувало інгібуючий вплив диклофенаку на синтез вказаних вазоактивних медіаторів та нормалізувало регуляторний вплив H_2S на тонус мезентеріальних судин. В той же час, введення НПЗЗ одночасно з ППГ значно збільшувало метаболічні пертурбації в обміні вазодилататорних молекул. Отже, рівень насиченості організму щурів гідроген сульфідом є одним із чинників, який визначає виразність впливу НПЗЗ на динамічну рівновагу в системі вазодилататори/вазоконстриктори та стан мікроциркуляції СОШ. Серед можливих молекулярних механізмів, через які реалізується здатність H_2S попереджувати НПЗЗ-індуковану вазоконстрикцію, можна виділити наступні: прямий стимулюючий вплив H_2S на активність NO-синтази; не виключено безпосередній активуючий вплив H_2S , або надлишку NO на PGH-синтазну активність; зменшення окиснювальної модифікації активних центрів редокс-чутливих протеїнів - NO-синтази та PGH-синтази, що асоціюється з антиоксидантною дією H_2S [222, 223, 225, 227].

Тобто, дослідження показали, що застосування диклофенаку натрію веде до зменшення в СОШ активності ферментів ЦГЛ, NO-синтази та PGH-синтази (на 17-24 %), вмісту їх метаболітів H_2S , нітритів та нітратів (на 20-22%) та супроводжується зниженням чутливості мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S (EC_{50} збільшувалась на 27,5 %)

Введення НПЗЗ на тлі дефіциту H_2S супроводжувалось збільшенням депримуєчого впливу диклофенаку натрію на продукцію досліджуваних вазоактивних молекул та H_2S -індуковану релаксацію мезентеріальних артерій.

Застосування НПЗЗ на тлі надлишку H_2S практично повністю нівелювало негативний вплив диклофенаку натрію на утворення NO,

вазодилататорних простагландинів, H_2S та процеси регуляції скоротливості мезентеріальних артерій за участі H_2S .

4.5 Вплив донору H_2S на індуковані диклофенаком зміни клітинного циклу та процесів апоптозу в тканинах шлунку

Відомо, що гастротоксична дія НПЗЗ реалізується за рахунок пошкодження всіх рівнів захисту слизової оболонки [6, 7, 8]. В попередній частині роботи було показано, що ступінь пошкоджуючої дії зростав за умов введення щурам ППГ (інгібітору синтезу H_2S), та зменшувався за умов додаткового введення його донору - $NaHS$. Для перевірки гіпотези про здатність H_2S протидіяти пошкодженню СОШ, індукованого диклофенаком натрію, в тому числі, і шляхом впливу на показники клітинного циклу та антиапоптотичної дії, в цій частині роботи було визначено показник фрагментації ДНК та інші характеристики клітинного циклу щурів, яким диклофенак натрію вводили разом із донором H_2S та без останнього.

Результати засвідчили, що введення щурам досліджуваного НПЗЗ викликає суттєві зміни клітинного циклу в епітелії слизової оболонки шлунка (табл. 4.11).

Можна відмітити, що у тварин, яким вводили диклофенак натрію, кількість клітинних подій в інтервалі G_0G_1 , яка відображає процеси апоптозу в СОШ, становила $12,6 \pm 4,26$ %, що вірогідно (в 2,43 рази) перевищувало аналогічний показник у тварин контрольної групи, і свідчило про більшу частку ядер клітин з фрагментованою ДНК і, відповідно, індукцію апоптозу клітин слизової оболонки шлунка досліджуваним лікарським засобом.

У тварин, яким вводили диклофенак, зареєстровано вірогідне (в 1,8 рази) зменшення відсотку клітин СОШ з вмістом ДНК $>2c$ і $<4c$, тобто таких, що перебувають в фазі синтезу ДНК (S-фазі). Ці показники у тварин обох груп становили, відповідно $6,24 \pm 2,02$ та $3,52 \pm 1,16$ %. Ці зміни свідчать про пригнічення синтезу ДНК клітин слизової оболонки шлунка у щурів та його

антипроліферативну активність та цілком співставлялись з проявами макроскопічних диклофенак-індукованих змін в СОШ.

Таблиця 4.11

Показники клітинного циклу клітин слизової оболонки шлунка щурів, які отримували монотерапію диклофенаком натрію, а також його сумісного застосування разом з натрій гідрогенсульфідом ($M \pm \sigma$, $n=6$)

Групи тварин	Показники клітинного циклу						
	SUB-G0G1	G0G1	S	G2+M	IP	BP	CV
Контроль	5,20± 1,81	81,94± 2,60	6,24± 2,02	11,82± 1,26	18,06± 2,60	0,53± 0,16	5,92± 0,30
Диклофенак натрій (Д) (8 мг/кг в/шл)	12,63± 4,26*	81,32± 2,11	3,52± 1,16*	15,15± 1,21*	18,67± 2,11	0,23± 0,07*	6,86± 0,96
NaHS (1,5 мг/кг в/оч) + Д (8 мг/кг в/шл)	7,49± 1,73*#	83,31± 4,04	6,07± 1,72#	10,62± 2,92#	16,69± 4,04	0,59± 0,14#	6,92± 0,97

Примітки:

1. * - позначена статично значуща ($p < 0,05$) різниця із показниками групи контрольної групи тварин;
2. # - позначена статично значуща ($p < 0,05$) різниця із показниками групи контрольної тварин, яким вводили диклофенак натрій.

У тварин, які отримували диклофенак натрію, кількість клітин з вмістом ДНК=4с, тобто таких, що перебували в фазі G2+M становив в середньому $15,15 \pm 1,21$ проти $11,82 \pm 1,26$ % в контролі, тобто був більшим в 1,3 рази. Це, на нашу думку, може бути пов'язано з певною затримкою або блокадою мітозів на фоні дії диклофенаку натрію (затримка у фазі G2+M). Про затримку проліферації також свідчить і виявлене достовірно менше (у 2,3 рази, ($p < 0,05$),

порівняно з контрольною групою тварин, середнє значення показнику блоку проліферації клітин слизової оболонки шлунку щурів. Зокрема, в групі контролю показник блоку проліферації склав $0,53 \pm 0,16$, а в дослідній групі – $0,23 \pm 0,07$ (див. табл. 4.11). Водночас, показник індексу проліферації у контрольних та дослідних тварин практично не відрізнявся. Тим не менше, виявлене нами і описане вище «розбалансування» між фазами S та G2 + M на фоні застосування диклофенаку натрію, можна думати, є одним із механізмів ерозивної або ульцерогенної дії цього препарату.

Таким чином, виявлено, що диклофенак натрію при його внутрішньошлунковому введенні щурам в середній ефективній дозі викликає суттєві дистрофічно-дегенеративні зміни в СОШ, і одну з головних ролей в цьому процесі відіграє стимуляція процесів апоптозу на тлі розбалансування процесів регенерації слизової оболонки.

Додаткове введення щурам NaHS в умовнотерапевтичній дозі суттєво модулювало пошкоджуючу дію досліджуваного НПЗЗ на показники клітинного циклу слизової оболонки шлунка щурів. Так, в групі піддослідних тварин, які отримували диклофенак натрію та донор H_2S , зареєстровано вірогідно менша кількість клітинних подій в фазі G0G1 (в 1,68 рази, $p < 0,05$), порівняно з монотерапією диклофенаком, що свідчить про антиапоптотичну дію натрію гідроген сульфід. Також в цій групі тварин виявлено зростання середнього показника S фази (в 1,7 рази), збільшення майже на третину кількості клітин, які перебувають у фазі G2+M, а також зростання показника блоку проліферації (в 2,5 рази, $p < 0,05$), порівняно з монотерапією диклофенаком. При порівнянні показників клітинного циклу та фрагментації ДНК в СОШ щурів, які отримували диклофенак натрію та донор H_2S з такими у тварин контрольної групи, не було встановлено вірогідних відмінностей. Досліджувані параметри практично наближались до таких у тварин інтактної групи.

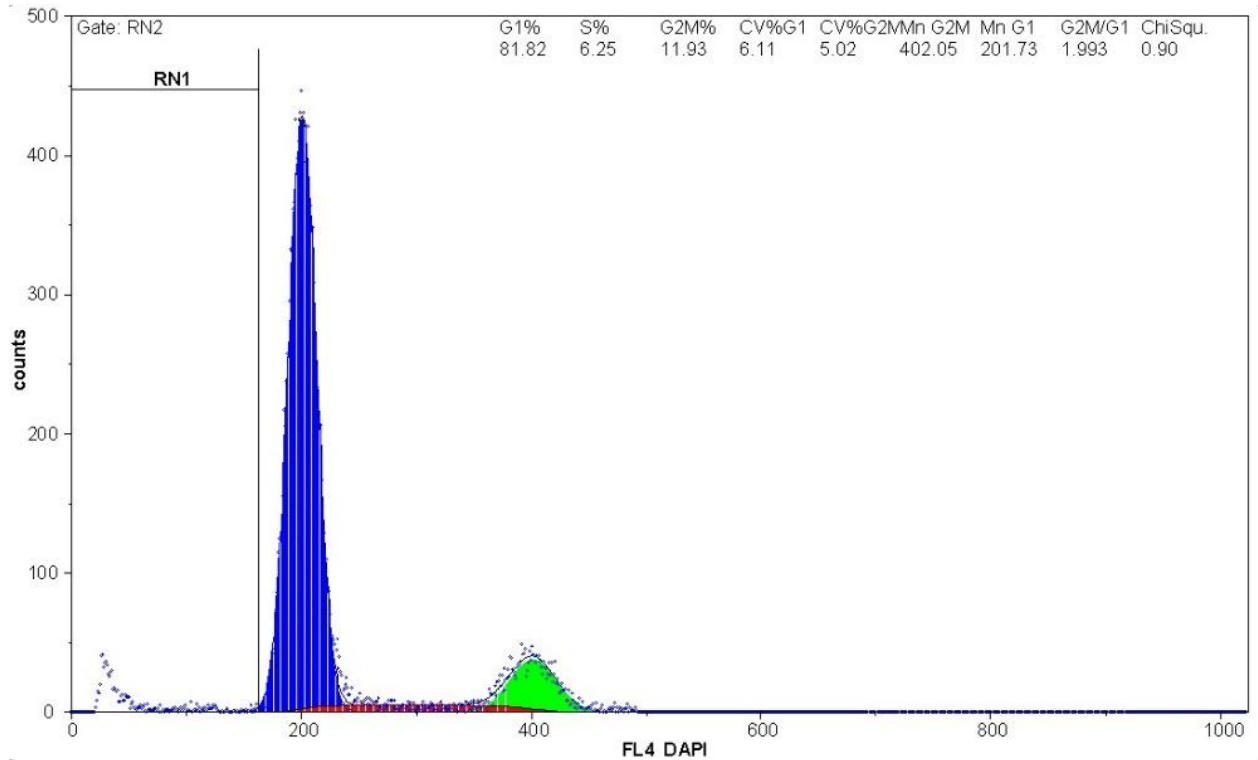


Рис.4.6 ДНК-грама ядерної суспензій клітин слизової оболонки шлунка щура контрольної групи. RN1 – фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 5,50 %. Синтез ДНК (S%) = 6,25%. G2 + M (4c) = 11,93%. CV = 6,11%. Кількість подій 20000.

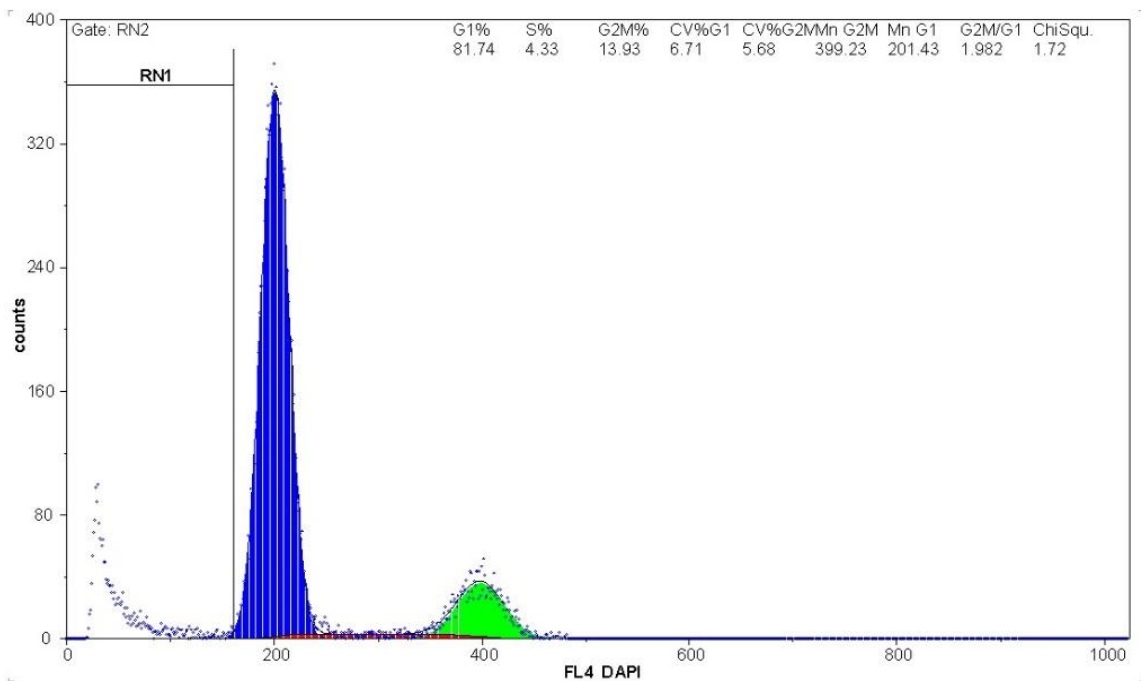


Рис.4.7 ДНК-грама ядерної суспензій клітин слизової оболонки шлунка щура на тлі введення диклофенаку натрію. RN1 – фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 13,05 %. Синтез ДНК (S%) = 4,33%. G2 + M (4c) = 13,93%. CV = 5,33%. Кількість подій 20000.

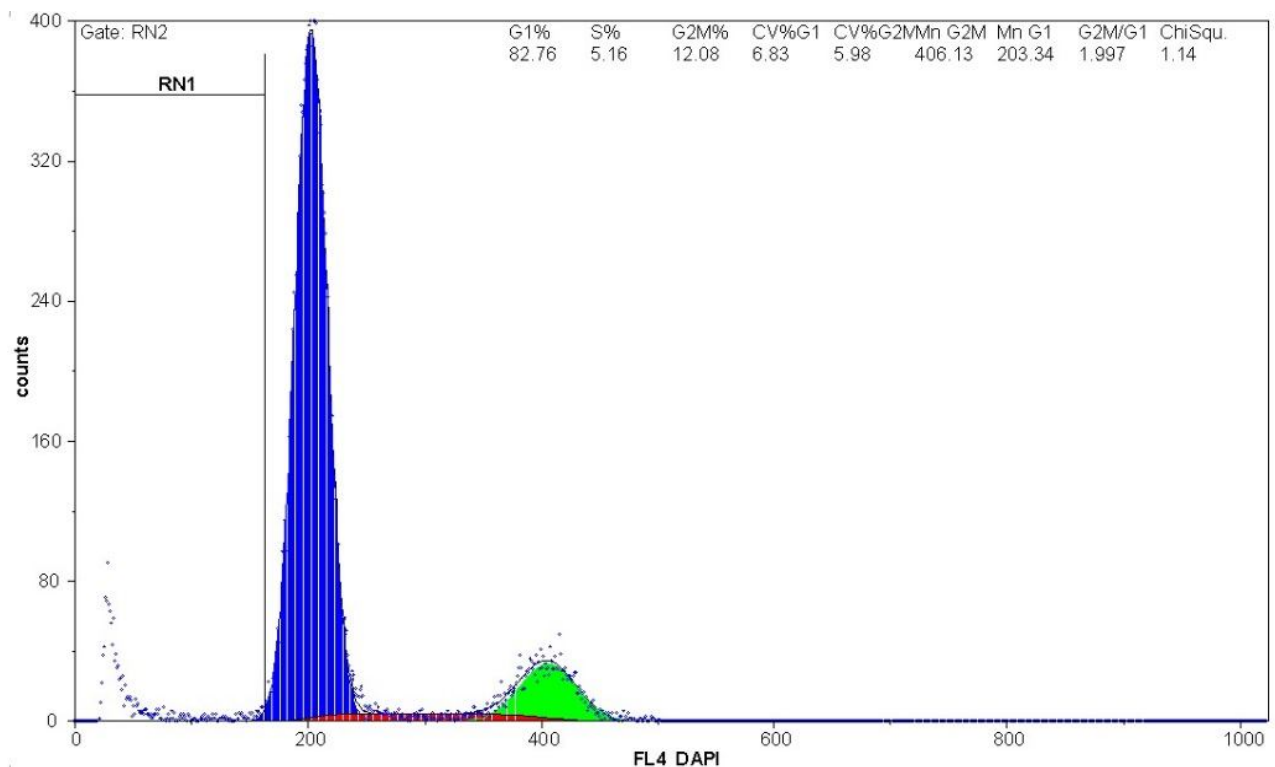


Рис.4.8 ДНК-грама ядерної суспензій клітин слизової оболонки шлунка щура на тлі введення диклофенаку натрію та NaHS. RN1 – фрагментація ДНК (SUB-G0G1, апоптоз) = 7,90 %. Синтез ДНК (S%) = 5,16%. G2 + M (4с) = 12,04%. CV = 6,77%. Кількість подій 20000.

Приклади ДНК-гістограм ядерних суспензій клітин епітелію СОШ щура контрольної групи, а також тварин, які отримували диклофенак натрію в якості монотерапії та при його введенні разом з донором H_2S представлено на рисунках 4.6, 4.7 та 4.8 відповідно.

Резюме

Таким чином, рівень насиченості організму H_2S суттєво модулював ступінь гастротоксичності диклофенаку натрію: дефіцит H_2S – збільшує, тоді як надлишок його - навпаки, зменшує пошкоджуючий вплив досліджуваного НПЗЗ на шлунок. Внутрішньошлункове введення донору H_2S протягом 5 днів разом із диклофенаком натрію в умовно терапевтичних дозах (4 мг/кг та 8 мг/кг, відповідно) практично не впливало на секреторну та моторну функції

травного тракту щурів та викликало вірогідно менші макроскопічні зміни в СОШ порівняно із монотерапією нестероїдним активізатором.

Введення диклофенаку викликало виражені зміни біохімічних параметрів СОШ: зменшувався рівень H_2S в тканинах шлунку, зростала інтенсивність окисної деструкції ліпідів білків, виникав дисбаланс в системі про-антиоксиданти, зменшувався вміст фосфоліпідів та порушувався співвідношення між окремими фракціями, знижувалась ензиматична продукція простагландинів, H_2S та нітроген монооксиду.

За цих умов знижувалась чутливість стінки мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S . Застосування донору H_2S запобігало негативній дії диклофенаку на метаболізм шлунку, стан клітинних мембран та скоротливість мезентеріальних артерій, тоді як введення інгібітору синтезу H_2S в значній мірі потенціювало гастротоксичний ефект вказаного НПЗЗ.

NaHS проявляв антиапоптотичну дію та виявляв виражений коригуючий вплив на зміни показників клітинного циклу СОШ, викликані диклофенаком натрію у щурів.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:

1. Таран І. В. Вираженість гастротоксичної дії диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфід у експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – №4-5 (40). – С. 17–24.

2. Taran I. V. Influence of diclofenac sodium on biochemical indicators of stomach mucosa conditions against the background of excess and deficiency of hydrogen sulfide in rats / N. I. Voloshchuk, I. V. Taran, A. V. Mel'nik // The Science Advanced. – 2015. – Vol.01. – P. 36-40. Taran I. V. Vascular mechanism in the diclophenac induced gastrototoxicity: the association with the level of hydrogen sulfide / N. I. Voloshchuk, I. V. Taran, A. V. Mel'nik // Curierul medical. – 2015. – Vol.58, №1. – P. 7-11.

3. Таран І. В. Зміни біохімічних показників гастротоксичності диклофенаку натрію за умов дефіциту та надлишку гідроген сульфід / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології : науково-практична конференція з міжнародною участю, 26-27 вересня 2013 р., Харків : матер. – Харків, 2013. – С. 165.

4. Таран І. В. Вікові зміни продукції гідроген сульфід слизовою оболонкою шлунка в реалізації гастротоксичності НПЗЗ у щурів. / Н. І. Волощук, І. В. Таран, А. В. Мельник, О. С. Ольховський // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – №5(24). С. 59 (IV Національний з'їзд фармакологів України. Київ, 10-12 жовтня 2011р. : тези доповідей).

5. Таран І. В. Зміни фармакологічного профілю диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфід / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Клиническая фармакология и фармакотерапия заболеваний в свете доказательной медицины : VII Всеукраинская научно-практическая конференция с международным участием по клинической фармакологии, 25-26 ноября 2013 г., Винница : матеріали. – Вінниця, 2013. – С. 213–214.

6. Таран І. В. Вплив гідроген сульфід на індуковані диклофенаком зміни слизової оболонки шлунка у щурів з автоімунним запальним процесом, / Н. І. Волощук, І. В. Таран, А. В. Мельник, Н. В. Заїчко // Укр. біохім. журн. – 2014. Vol. 86, № 5 (supp. 2). – С. 36-37 (XI Український біохімічний конгрес. Київ, 6-10 жовтня 2014 р. : матеріали).

7. Патент на корисну модель № UA 100342 Україна, МПК А61К 33/04 (2006.01) Застосування натрієвої солі гідроген сульфід як засобу для зменшення гастротоксичності нестероїдних протизапальних засобів. / Волощук Н.І. Таран І.В.; заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. - №u2015 00096; заявл.06.01.2015; опубл. 27.07.2015, Бюл.№14. - 4 с.

8. Таран І. В. Вплив донору гідроген сульфід на зміни клітинного циклу та фрагментацію ДНК на тлі диклофенак-індукованої гастропатії / І. В. Таран, І. Л. Черешнюк, Н. І. Волощук // Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини : VIII науково-практична

конференція з міжнародною участю з клінічної фармакології, 9-10 листопада 2015 р., Вінниця : тези доп. – Вінниця, 2015р. – С. 238-240.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ НАДЛИШКУ ТА ДЕФІЦИТУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА БАЗОВІ
ФАРМАКОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ

Проведені попередні дослідження переконливо засвідчили, що вміст H_2S в організмі суттєво змінює захисний потенціал СОШ, що проявляється на всіх рівнях його захисту - як передепітеліальному, так і епітеліальному та постепітеліальному. При цьому було виявлено, що саме збільшення вмісту H_2S чинить захисну дію на шлунок та збільшує здатність «опиратись» шкідливому впливу різних чинників, наприклад, НПЗЗ. Було зареєстровано вірогідне зменшення показників гастротоксичності диклофенаку натрію на тлі попереднього інтраперітонеального введення донору H_2S , а також і за умов сумісного введення цих сполук інтрагастрально.

Натомість, зниження вмісту H_2S в організмі, яке викликали введенням інгібітора його синтезу - ППГ - значно погіршувало біохімічні та фізіологічні параметри СОШ та супроводжувалось підвищенням ушкоджуючої дії диклофенаку на шлунок.

Все вищезазначене свідчить про покращення профілю безпеки диклофенаку на тлі зростання вмісту H_2S . Однак не менш важливим питанням, яке постає перед лікарем при виборі засобів для фармакотерапії запальних та больових синдромів, є ефективність НПЗЗ.

В літературі зустрічаються відомості про участь H_2S в модулюванні запального процесу і перцепції, проте це питання залишається до кінця не з'ясованим, оскільки дані літератури у багатьох питаннях суперечать один одному [98, 228, 229]. Залишаються невідомими механізми реалізації цих ефектів, а також вплив H_2S на фармакологічну активність лікарських засобів з анальгезуючою та протизапальною діями.

Тому метою наступного розділу роботи було оцінити зміни величини протизапального та знеболюючого ефектів диклофенаку на тлі додаткового введення донору H_2S та інгібітору його синтезу.

5.1 Дослідження анальгезуючої та протизапальної дії NaHS та ППГ

Встановлено, що введення донора H_2S в дозі 1,5 мг/кг внутрішньоочередно супроводжувалось помірною знеболюючою дією на моделі електричного подразнення, що проявлялося більш високими значеннями ПБЧ у щурів у порівнянні з такими до початку експерименту (на 17,4 %; 24,8 %; 23,3 % і 21,6 % на 1-ій, 2-ій, 4-ій і 6-ій годинах дослідження, відповідно) (рис. 1). Водночас, 5-ти денне введення тваринам інгібітора синтезу H_2S (ППГ) практично не змінювало вихідних значень порогу больової чутливості. Коливання ПБЧ знаходились в межах 5 % від вихідного рівня протягом всього часу експерименту.

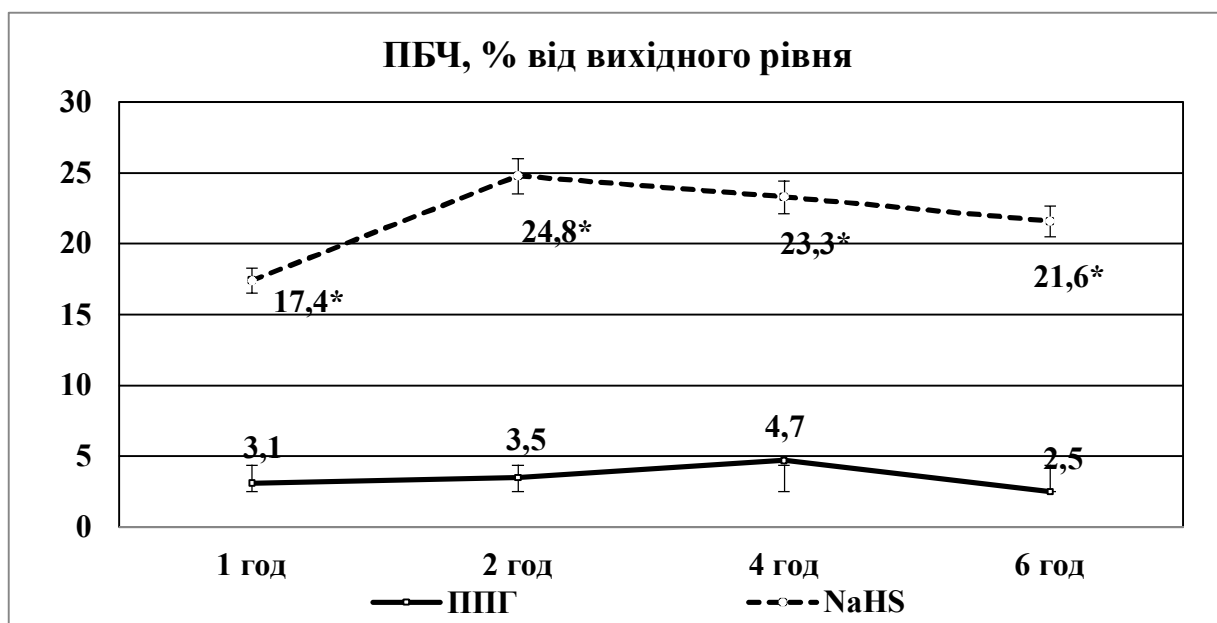


Рис. 5.1. Зміни порогу больової чутливості при електричному подразненні на тлі введення NaHS та ППГ.

Примітка. Знаком * позначено статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно вихідного рівня в кожній групі

Для оцінки центрального та периферичного компонентів антиноціцептивного ефекту досліджуваних сполук використовували модель формалінового тесту [197]. Щурам субплантарно в праву нижню кінцівку вводили 0,1 мл 5 % розчину формаліну. Ноціцептивна реакція у вигляді підняття і періодичного похитування лапи, а також її покусування або облизування складалась з двох стадій. Спостереження за тваринами проводилося впродовж 60 хвилин після введення формаліну. Зміни тривалості латентного періоду 2 фази і тривалості больової реакції в цій фазі свідчили про силу знеболюючої дії досліджуваних сполук.

Було виявлено незначний вплив NaHS на першу фазу больової реакції, що характеризується центральними механізмами перцепції (табл. 5.1). Тривалість латентного періоду на тлі його дії подовжувалась на 10,4 %, а тривалість болю скорочувалась на 6,3 %, проте ці зміни не сягали статистично вірогідних значень. В той же час, у другій (запальній) фазі цього тесту, антиноціцептивна дія була більш вираженою, що проявлялося достовірним подовженням латентного періоду болю (на 28,3 %) і скорочення тривалості больової реакції (на 31,7 %). 5-ти денне введення ППГ, як і на моделі електричного подразнення, не виявляло статистично значущих змін тривалості обох фаз формалінового тесту, і навіть в незначній мірі (на 10,6 %, $p>0,05$) збільшувало тривалість ознак альгезивної реакції у щурів в другій фазі цього досліду.

Таблиця 5.1

Аналгезуюча активність NaHS та ППГ на моделі формалінового тесту у щурів
($M \pm m$, $n=10$)

Умови дослідіу	I фаза (хв)		II фаза (хв)	
	Латентний період	Больова реакція	Латентний період	Больова реакція
Контроль	1,82±0,17	5,52±0,29	16,3±1,44	19,5±2,56
NaHS	2,01 ± 0,25	5,17±0,92	20,9±1,27*	13,3±1,60*
Пропаргілгліцин	1,93 ± 0,36	5,58 ± 1,17	15,5 ± 1,16	21,8 ± 2,48

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю.

Таким чином, визначено, що 5-ти денне введення донору H_2S супроводжується помірною аналгетичною активністю, яка була більш виразною в умовах моделювання запального процесу, що на нашу думку, може бути наслідком його системних ефектів (вираженою антиоксидантною дією та мембраностабілізуючою властивістю) [191, 230, 231], а також його антиексудативним ефектом. Не виключено, що зменшення запального набряку усуває механічне подразнення больових рецепторів у вогнищі запалення.

Для підтвердження цього припущення в наступній частині експерименту було досліджено вплив донору і інгібітору синтезу H_2S на виразність запального процесу. Результати (табл. 5.2, табл. 5.3) показали, що донор H_2S володів протизапальною дією, про що свідчить вірогідне ($p < 0,05$) зменшення ступеня набряклості кінцівки в групі мишей на моделі карагенінового набряку, в порівнянні з тваринами контрольної групи. Антиексудативна активність цієї сполуки складала 32,3 %.

Таблиця 5.2

Антиексудативна активність NaHS та ППГ на моделі карагенінового набряку у мишей ($M \pm m$, $n=10$)

№ групи	Умови досліджу	Середня маса кінцівки, мг		Приріст маси, мг	Антиексудативна активність
		здорова	набрякла		
1	Контроль	955,0 $\pm$ 33,7	1510,0 $\pm$ 70,2#	555,0 $\pm$ 49,7	0
2	NaHS	1118,0 $\pm$ 50,5	1494,0 $\pm$ 64,9#	376,0 $\pm$ 33,6*	32,3%
3	Пропаргіл-ліцин	985,0 $\pm$ 24,8	1460,0 $\pm$ 61,8#	475,0 $\pm$ 72,5	14,4%

Примітки:

1. * - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) в прирості маси кінцівки порівняно з контролем;
2. # - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) маси між набряклою та ненабряклою кінцівкою в групі

За цих умов експерименту була зареєстрована помірна протизапальна дія ППГ: антиексудативна активність цієї сполуки становила 14,4 %.

Ще однією моделлю запальної реакції є модель формалінового набряку у щурів [179], який відтворювали субплантарним введенням 0,1 мл 5 % розчину флогогену та спостерігали за розвитком запальної реакції через 1 годину. Про антиексудативну активність судили за зміною товщини ураженої кінцівки порівняно зі здоровою. Було встановлено (табл.5.3), що NaHS і на цій моделі патологічного процесу виявляв антиексудативну дію, яка, проте, поступалась такій при введенні карагеніну (антиексудативна активність NaHS становила 21,3%).

Таблиця 5.3

Антиексудативна активність NaHS та ППГ на моделі формалінового набряку у щурів ($M \pm m$, $n=10$)

№ гру пи	Умови дослідю	Середня товщина кінцівки, мм		Приріст товщини, мм	Антиексуда- тивна активність
		здорова	набрякла		
1	Контроль	4,30±0,09	5,71±0,23#	1,41±0,26	0%
2	NaHS	4,28±0,14	5,39±0,18#	1,11±0,12	21,3%
3	Пропаргілгліцин	4,16±0,07	5,50±0,14#	1,34±0,13	4,9%

Примітки:

1. * - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) в прирості маси кінцівки порівняно з контролем;
2. # - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) маси між набряклою та ненабряклою кінцівкою в групі

ППГ, як і в попередній моделі, практично не виявив антиексудативної активності.

5.2 Дослідження змін анальгезуючого та протизапального ефектів диклофенаку натрію на тлі модулювання обміну H_2S

На тлі впливу попереднього 5-ти денного внутрішньочеревного введення донору H_2S та інгібітора його синтезу оцінено анальгезуючий та протизапальний ефекти диклофенаку натрію при його одноразовому внутрішньошлунковому введенні. Було встановлено що на моделі електричного подразнення (рис. 5.2) знеболююча дія диклофенаку натрію за попереднього введення NaHS була більш виразною, ніж монотерапія, особливо на пізніх етапах експерименту, і досягала статистично достовірних значень ($p < 0,05$) на 4-ій і 6-ій годині після введення НПЗЗ (42,5 % і 57,3 % проти 36,5 % і 30,7 %, відповідно).

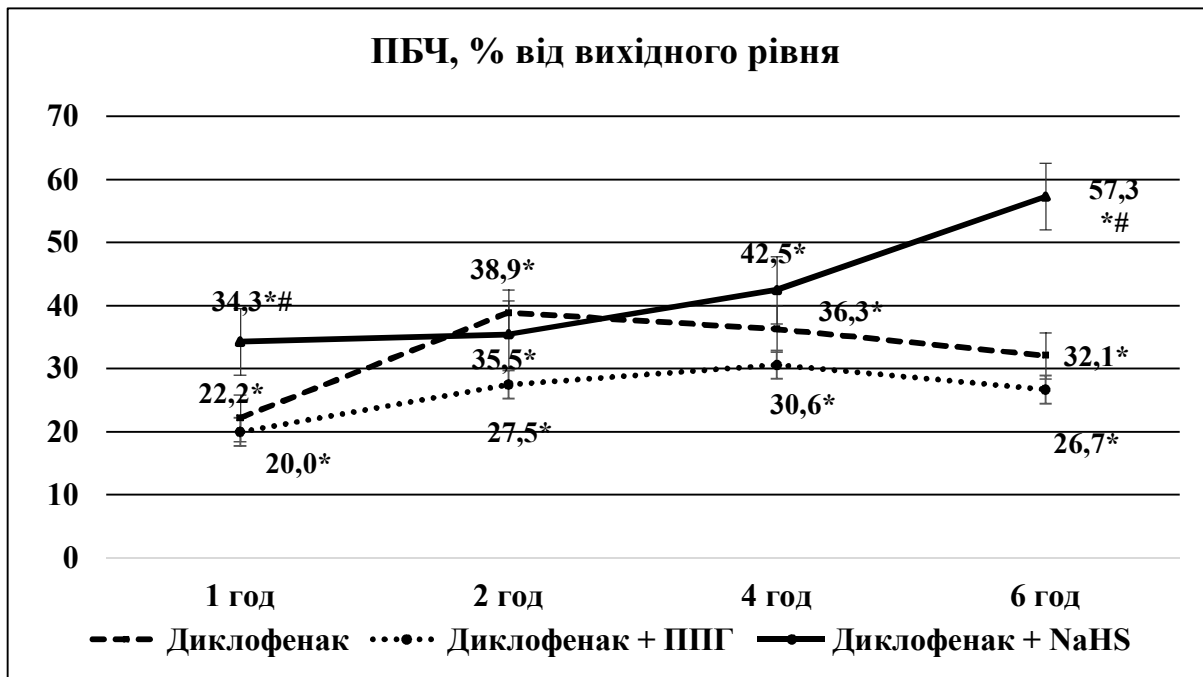


Рис. 5.2 Зміни анальгезуючої дії диклофенаку при електричному подразненні на тлі введення NaHS та ППГ.

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно вихідного рівня в кожній групі
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку

Зниження вмісту в крові H_2S , спричинене ППГ, навпаки, незначно зменшувало антиноціцептивну дію диклофенаку у всі терміни дослідження, однак ці відмінності були невірогідними і не виходили за межі стандартної похибки.

На моделі формалінового тесту (табл. 5.4) було виявлено, що додаткове введення донора H_2S сприяло більш виразному антиноціцептивному ефекту диклофенаку натрію в обидві фази вказаного тесту, однак статистичної значущості ці відмінності сягали лише в II (запальній фазі). При цьому було зареєстровано достовірне збільшення (на 95,0 %) тривалості латентного періоду II фази та зменшення (на 63,4 %) в досліджуваній фазі часу больової реакції в заданих умовах експерименту. Дані показники вірогідно перевищували такі, що були отримані при монотерапії досліджуваним НПЗЗ на 29,3 і 39,7 %, відповідно.

Таблиця 5.4

Вплив $NaHS$ та ППГ на анальгезуючу активність диклофенаку натрію на моделі формалінового тесту у щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	I фаза (хв)		II фаза (хв)	
	Латентний період	Больова реакція	Латентний період	Больова реакція
Контроль	$1,82 \pm 0,17$	$5,52 \pm 0,29$	$16,3 \pm 1,44$	$19,5 \pm 2,56$
Диклофенак-натрій	$2,28 \pm 0,34$	$5,06 \pm 0,60$	$24,5 \pm 1,76^*$	$11,8 \pm 1,01^*$
Диклофенак-натрій + $NaHS$	$2,58 \pm 0,35$	$4,91 \pm 0,68$	$31,8 \pm 2,50^{* \#}$	$7,11 \pm 0,85^{* \#}$
Диклофенак-натрій + Пропаргілгліцин	$2,24 \pm 0,30$	$5,11 \pm 0,84$	$20,3 \pm 2,08^*$	$14,7 \pm 2,04^*$

Примітки:

1. * - статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності щодо контролю;
2. # - статистично вірогідні ($p < 0,05$) відмінності щодо диклофенак-натрію

При цьому, терапія диклофенаком натрію на тлі зниженого вмісту H_2S ,

викликаного пропаргілгліцином, практично не відрізнялась за своєю ефективністю від монотерапії НПЗЗ, як за показниками I, так і II фази формалінового тесту.

Модулювання вмісту H_2S в організмі відбивалось і на виразності протизапальної дії диклофенаку натрію, як було встановлено на моделі карагенінового та формалінового набряків (табл. 5.5, табл. 5.6). Введення H_2S тваринам, які отримували в якості протизапального агента диклофенак, посилювало антифлогогенну дію останнього за умов карагенінового набряку у мишей. Антиексудативна активність цієї комбінації склала 81,9 %, тоді як монотерпія диклофенаком зменшувала ступінь набряку лише на 54,9 %.

Таблиця 5.5

Антиексудативна активність диклофенаку натрію на тлі введення NaHS та ППГ на моделі карагенінового набряку у мишей ($M \pm m$, $n=10$)

№ групи	Умови дослідження	Середня маса кінцівки, мг		Приріст маси, мг	Антиексудативна активність
		здорова	набрякла		
1	Контроль	955,0 $\pm$ 33,7	1510,0 $\pm$ 70,2#	555,0 $\pm$ 49,7	0
2	Диклофенак натрій	1100,0 $\pm$ 34,2	1350,0 $\pm$ 46,5#	250,0 $\pm$ 53,2*	54,9%
3	Диклофенак +NaHS	1100,0 $\pm$ 35,7	1200,0 $\pm$ 30,7	100,0 $\pm$ 28,9 */**	81,9%
4	Диклофенак натрій +Пропаргілгліцин	1085,0 $\pm$ 40,9	1313,0 $\pm$ 42,4#	227,5 $\pm$ 35,4*	59,0%

Примітки:

1. * - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) в прирості маси кінцівки порівняно з контролем;
2. ** - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) в прирості маси кінцівки порівняно з диклофенаком;
3. # - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) маси між набряклою та ненабряклою кінцівкою в групі;

Аналогічні результати (посилення антифлогогенної активності диклофенаку натрію на тлі зростання вмісту H_2S) спостерігались на моделі

формалінового набряку у щурів. Антинабрякова активність при сумісному застосуванні диклофенаку натрію і NaHS була в 1,7 разів більшою, ніж монотерапія диклофенаком (табл. 5.6).

Антиексудативна активність диклофенаку на тлі додаткового введення ППГ становила 59,0 та 42,7% за умов карагенінового та формалінового набряків, відповідно, та практично не відрізнялась від монотерапії НПЗЗ (54,9 та 38,3 %, відповідно) (табл. 5.5, 5.6).

Таблиця 5.6

Антиексудативна активність диклофенаку натрію на тлі введення NaHS та ППГ на моделі формалінового набряку у щурів ($M \pm m$, $n=10$)

№ групи	Умови досліджу	Середня товщина кінцівки, мм		Приріст товщини, мм	Антиексудативна активність
		здорові	набрякла		
1	Контроль	4,30 $\pm$ 0,09	5,71 $\pm$ 0,23#	1,41 $\pm$ 0,26	0%
2	Диклофенак натрій	4,53 $\pm$ 0,11	5,40 $\pm$ 0,14#	0,87 $\pm$ 0,14*	38,3%
3	Диклофенак +NaHS	4,33 $\pm$ 0,08	4,79 $\pm$ 0,08#	0,46 $\pm$ 0,06**	67,5%
4	Диклофенак натрій +пропаргілгліцин	4,42 $\pm$ 0,10	5,23 $\pm$ 0,18#	0,81 $\pm$ 0,15*	42,7%

Примітки:

1. * - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) в прирості маси кінцівки порівняно з контролем;
2. ** - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) в прирості маси кінцівки порівняно з диклофенаком;
3. # - вірогідність відмінностей ($p < 0,05$) маси між набряклою та ненабряклою кінцівкою в групі;

Виявлена протизапальна та знеболююча дію H_2S зіставлялась з механізмами фармакодинаміки диклофенаку натрію та має синергічний вплив на його протизапальний і антиноцицептивний ефекти. Крім того, не виключено існування також і інших механізмів терапевтичної дії цієї біологічно активної молекули на прояви запального процесу та перцепцію, зокрема, зменшення

продукції прозапальних цитокінів, вмісту цАМФ, модуляції NMDA-рецепторів, впливу на потенціал-залежні К-АТФ канали тощо [231, 232, 233, 234].

Резюме

Донор H_2S при 5-ти денному введенні в умовно терапевтичній дозі ($1/20 LD_{50}$) щурам викликав слабку аналгетичну дію у інтактних тварин і статистично значимий антиноціцептивний ефект в умовах асептичного запалення (формалінового тесту). На моделях запальних процесів (формалінового і карагенінового набряку) у мишей і щурів, відповідно, донор H_2S викликав виразну антиексудативну дію.

NaHS вірогідно збільшував антиноціцептивну дію диклофенаку натрію як на моделі електричного подразнення у щурів, так і в запальній фазі формалінового тесту. Водночас, попереднє введення NaHS істотно посилювало протизапальний ефект диклофенаку натрію в умовах простагландин-індукованого запального процесу (карагенінового і формалінового набряків).

Інгібітор синтезу H_2S – пропаргілгліцин – практично не впливав на прояви ноціцептивної реакції та запального процесу у піддослідних тварин, а також не виявив значущого впливу на базові фармакологічні ефекти нестероїдного протизапального засобу.

Основні наукові результати розділу 5 висвітлені в наступних публікаціях:

1. Таран І. В. Гостра токсичність гідроген сульфїду та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Медична хімія. – 2011. – Т.13. – №4 (49). – С. 88–91.
2. Таран І. В. Влияние сульфиди водорода на анальгезирующий и противовоспалительный эффекты диклофенака натрия в эксперименте / Н. И. Волощук, И. В. Таран, С. А. Конюх // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – Т. 50, №2. – С. 51-54.
3. Таран І. В. Вплив гідроген сульфїду на гостру токсичність та протизапальний ефект диклофенаку у мишей / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011, №1. – С. 45

(Актуальні проблеми сучасної медицини : науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю. Київ, 12-14 жовтня 2011 р. : матеріали).

4. Taran I. V. Experimental Evaluation The Influence Of Hydrogen Sulfide On The Pharmacological Effect And Toxicity Of Diclophenac Sodium / N. I. Voloshchuk, I. V. Taran // Перший Україно-Йорданський конгрес, 12-17 вересня 2011р., Вінниця : матеріали. – Вінниця, 2011. – С. 36-37.

5. Таран І. В. Зміни фармакологічного профілю диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфідів / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Клиническая фармакология и фармакотерапия заболеваний в свете доказательной медицины : VII Всеукраинская научно-практическая конференция с международным участием по клинической фармакологии, 25-26 ноября 2013 г., Винница : матеріали. – Вінниця, 2013. – С. 213–214.

6. Патент на корисну модель № UA 100326 U Україна, МПК (201501) A61M 21/00 Застосування натрієвої солі гідроген сульфідів для потенціювання анальгетичного ефекту нестероїдних протизапальних засобів / Волощук Н.І. Таран І.В.; заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. - №u2014 14057; заявл.27.07.2015; опубл. 27.07.2015, Бюл.№14. - 4 с.

7. Патент на корисну модель № UA 100327 U Україна, МПК (201501) A61K 33/00 , A61M 21/00 Застосування натрієвої солі гідроген сульфідів для потенціювання антифлогенної активності нестероїдних протизапальних засобів / Волощук Н.І. Таран І.В.; заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. - №u2014 14058; заявл.27.07.2015; опубл. 27.07.2015, Бюл.№14. - 4 с.

8. Таран І. В. Застосування донору гідроген сульфідів для підвищення протизапального та анальгезуючого ефектів натрієвої солі 2-[(2,6-дихлорфеніл)-аміно]-фенілоцтової кислоти : інформ. лист / Н. І. Волощук, І. В. Таран, С. А. Конюх. – К., 2015. - №162-2015. - 4 с. – Вип. 10 з проблеми «Фармакологія».

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗЗ) - це великий клас лікарських засобів, які займають провідне місце в фармакотерапії патологічних процесів, що проявляються больовим синдромом, запаленням та лихоманкою. Безконтрольне використання цих препаратів супроводжується розвитком побічних та небажаних ефектів, серед яких найчастіше зустрічаються гастропатії (ерозії та пептичні виразки шлунку) [4, 6, 7, 8,]. Вплив НПЗЗ на слизову оболонку шлунку (СОШ) реалізується через різноманітні молекулярні механізми [55, 220]. Препарати цієї групи порушують передепітеліальні фактори захисту СОШ, адже викликають руйнування слизово-бікарбонатно-фосфоліпідного «бар'єру» клітин поверхневого епітелію шлунку. Також НПЗЗ змінюють епітеліальний компонент захисту, який визначається стійкістю поверхні епітеліальних клітин і міжклітинних контактів до зворотної дифузії іонів гідрогену, гідрофобними властивостями слизової оболонки, що сприяють «відштовхуванню» хлороводневої кислоти, а також досить високою здатністю епітеліальних клітин до проліферації. Локальні токсичні ефекти НПЗЗ можуть бути пов'язані з їхньою здатністю індукувати процеси оксидативного стресу, впливати на внутрішньоклітинну концентрацію кальцію, знижувати утворення глутатіону, роз'єднувати тканинне дихання та окисне фосфорилування, посилювати хемотаксис нейтрофілів в слизовій оболонці шлунку.

З метою профілактики розвитку НПЗЗ-індукованих ускладнень існують кілька підходів:

1) одночасний прийом препаратів, які захищають слизову оболонку шлунку (інгібітори протонної помпи, аналоги простагландину E_2 , блокатори H_2 рецепторів гістаміну, тощо). Однак жодний з цих засобів не вирішує проблеми безпеки лікування НПЗЗ, оскільки має свої власні побічні ефекти [2, 6, 16, 18, 235, 236];

2) використання селективних інгібіторів ЦОГ-2 (коксибів), дещо зменшує ризик гастропатій, але водночас їхній прийом може викликати порушення з боку серцево-судинної, видільної системи та зсідання крові [18, 19, 20];

3) одночасне застосування препаратів із груп ізофлавоноїдів (ЕКСО) [22] та флавоноїдів (корвітин) [23].

Однак, існування такого широкого кола лікарських засобів для профілактики НПЗЗ-гастротоксичності, не вирішує проблеми, про що свідчить висока захворюваність і смертність, асоційована з прийомом препаратів НПЗЗ [4, 25, 26, 27, 78].

На думку науковців, молекула гідроген сульфїду (H_2S), є важливим цитопротектором, здатна регулювати процеси запалення, апоптозу і виявляти властивості гастропротектора [34, 37, 82]. На сьогодні залишається нез'ясованим, в якій мірі терапевтичні та небажані ефекти НПЗЗ, зокрема гастротоксичність, реалізуються через вплив на систему продукції H_2S . Не встановлено також вплив донорів H_2S та інгібіторів його синтезу на розвиток небажаних ефектів НПЗЗ та їх фармакологічну активність. Тому, метою нашого дослідження було експериментальне обґрунтування нових підходів щодо зменшення гастротоксичної дії диклофенаку натрію на основі вивчення змін захисних властивостей слизової оболонки шлунка та фармакодинамічних ефектів цього НПЗЗ за умов різної насиченості організму гідроген сульфїдом.

За проведених трьох етапів були з'ясовані питання щодо ролі модулювання вмісту H_2S у реалізації захисного потенціалу слизової оболонки шлунка у інтактних тварин (розділ 3); впливу різного вмісту H_2S на зміни захисних властивостей слизової оболонки шлунка щурів за умов гастропатії, індукованої диклофенаком натрію (розділ 4); впливу надлишку та дефіциту H_2S на базові фармакологічні ефекти диклофенаку натрію (розділ 5).

За макроскопічної оцінки стану СОШ у щурів, яким проводили введення $NaHS$ та ППГ не виявило суттєвих змін у таких показниках цілісності СОШ як гіперемія, складчатість, наявність ерозій, здуття шлунку, геморагій у інтактних щурів. На тлі 5-ти денного введення $NaHS$ лише у 1 тварини було зафіксовано ознаки гіперемії без змін інших показників. За умов введення ППГ були

помічені ознаки порушення цілісності шлунку: у трьох тварин спостерігалось здуття шлунку, набряк слизової оболонки легкого та середнього ступенів, а також у 4 тварин були знайдені геморагічні зміни слизової без порушень складчатості.

Різна насиченість організму щурів H_2S мала виразний вплив на біохімічні показники стану слизової оболонки шлунку. Введення NaHS сприяло достовірному зростанню вмісту глікозаміногліканів в слизовій шлунку на 16,6 %, тоді як ППГ – зменшував їх рівень на 18,5 % (рис. 3.2.). Отримані дані засвідчують, що дефіцит H_2S мав негативний вплив на продукцію слизу в шлунку.

За умов експерименту також змінювався фосфоліпідний спектр клітинних мембран СОШ. Донор H_2S викликав статистично вірогідне зменшення вмісту ЛФХ (на 18,2 %, $p < 0,05$); рівень інших фосфоліпідів достовірно не відрізнявся від контролю. На тлі дефіциту H_2S виникали значні зміни у нормальному співвідношенні фосфоліпідів: зменшувався вміст ЗФ та ФХ на 17,9 і 18,6 %, відповідно ($p < 0,05$) та одночасно зростав вміст ЛФХ на 21,8 ($p < 0,05$) (табл. 3.1). Зростання вмісту лізофосфоліпиду на тлі дефіциту H_2S ймовірно асоціюється з розвитком оксидативного стресу та активацією фосфоліпази A_2 [237].

Різна насиченість тварин H_2S впливала на активність процесів пероксидації ліпідів та окисної модифікації білків (табл. 3.2). Введення NaHS зменшувало ступінь пероксидації ліпідів і білків, про що свідчить вірогідне ($p < 0,05$) зменшення вмісту МДА та КГП на 19,4 та 17,1 %, відповідно. Натомість, ППГ вірогідно підвищував вміст продуктів пероксидації (вміст МДА зростав на 22,1 % а КГП – на 18,5 % ($p < 0,05$)). В багатьох дослідженнях доведена антиоксидантна здатність H_2S [238]. Дослідження проведені на волонтерах, які вживали воду, збагачену H_2S показали, що рівень МДА та продуктів пероксидації білків в плазмі крові цих людей достовірно менші, ніж у людей, які не отримували екзогенний H_2S [239]. Показано, що H_2S є скавенджером активних форм кисню та азоту. В концентрації 30 мкМ H_2S може реагувати з пероксинітридом, що супроводжується зниженням вмісту нітротирозину [240]. Також H_2S може безпосередньо взаємодіяти з NO і

утворювати нітрозотіол – тіонітрозильну кислоту [241]. H_2S є сильним відновником і тому може володіти прямою антиоксидантною дією. Антиоксидантні властивості H_2S , очевидно, пов'язані з його здатністю регулювати активність транскрипційних факторів, таких як Nrf2, який активує близько 200 генів білків, залучених до антиоксидантного захисту. Метаболізм H_2S тісно пов'язаний з тіолдисульфідним обміном та синтезом глутатіону [37, 242, 243, 244, 245], що має певний внесок в антиоксидантну дію H_2S . Також H_2S може пригнічувати процес ланцюгового утворення АФК в мітохондріях. Не виключено, що антиоксидантна дія H_2S реалізується через вплив на систему анти-/прооксидантних ензимів, що було досліджено далі.

Встановлено, що модуляція вмісту H_2S в сироватці крові мала суттєвий вплив на стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги СОШ (табл. 3.3.). Збільшення вмісту H_2S в крові супроводжувалось зростанням активності СОД та зменшенням активності НАДФН-оксидази (на 15,6 та 14,3 %, відповідно, $p < 0,05$). В той же час, ППГ чинив протилежну дію: на тлі його 5-ти денного введення активність СОД зменшувалась на 18,3 % ($p < 0,05$), а активність НАФН-оксидази збільшувалась на 19,0 % ($p < 0,05$). Різностямований вплив дефіциту та донору H_2S на стан про-/ антиоксидантної системи ймовірно є одним із чинників їх різновекторного впливу на активність процесів ліпопероксидації та окисної деструкції білків. В деяких дослідженнях показано, що антиоксидантна дія H_2S асоціювалась зі збільшенням активності антиоксидантних ензимів СОД, каталази та глутатіонпероксидази [246].

В механізмах розвитку пошкоджень шлунку важливу роль мають порушення мікроциркуляції, що виникають внаслідок гіперпродукції вазоконстрикторних та зменшення вмісту вазодилатуючих молекул. В літературі описані ціла низка біологічно активних речовин ендотеліального та плазменного походження, які регулюють тонус судин. Серед цих медіаторів до терапевтичного та токсичного впливів НПЗЗ причетні простагландини (PgI_2 , $PgF_{2\alpha}$), вільні радикали кисню, оксид азоту, а також, як було нещодавно встановлено H_2S [34, 247]. Тому далі було оцінено вплив різного рівня H_2S в сироватці крові на активність ферментів-продуцентів деяких вазоактивних

молекул – простагландин-Н-синтази, NO-синтази, цистатіонін-γ-ліази в слизовій оболонці шлунку щурів. Встановлено, що екзогенне введення донору H_2S викликало достовірне зростання активності ключового ферменту його синтезу в шлунку (цистатіонін-γ-ліази) та вмісту H_2S в СОШ на 15,7 та 12,7 %, відповідно. Натомість, в групі щурів, яким вводили ППГ, ці показники були меншими за контроль (на 16,1 та 17,1 %, відповідно) (див. табл. 3.4). Поряд з цим введення натрій гідрогенсульфіду тваринам супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної активності NO-синтази та рівня нітритів й нітратів (табл. 3.5) відповідно на 15,1 та 18,3 %, тоді як введення ППГ інвертувало вектор вказаних змін (активність NO-синтази була на 17,1 %, а рівень $NO_2^- + NO_3^-$ - на 19,3 % меншими, порівняно з контрольною групою тварин). Останнім часом показано, що між обміном H_2S та NO існує певний взаємозв'язок, однак дані щодо цього питання досить суперечливі [33]. Так, NO стимулює продукцію H_2S та експресію ЦГЛ в культурі гладком'язових клітин [247]. Вплив H_2S на утворення NO неоднозначний: низькі концентрації H_2S активують синтез NO, тоді як високі концентрації H_2S справляють протилежний ефект [144].

Різна насиченість організму тварин H_2S також відображається на стані простагландинової системи (рис. 3.3): на тлі 5-ти денного введення ППГ, активність простагландин-Н-синтази зменшилась на 15,1 % ($p < 0,05$), тоді як введення донору H_2S – навпаки викликає вірогідне зростання активності цього ензиму (на 14,3 %), відносно контролю. На сьогодні відсутні дані щодо молекулярних механізмів впливу H_2S на активність цього ферменту. Не виключено, що така дія H_2S реалізується через посттрансляційну модифікацію ензиму або шляхом впливу на активність певних транскрипційних факторів.

Застосування NaHS збільшувало чутливість мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S , про що доказово свідчить зміщення кривої «доза-ефект» ліворуч по відношенню до такої у тварин контрольної групи, а також вірогідне зменшення EC_{50} H_2S для мезентеріальної артерій на 27,2 %, порівняно з контролем (рис. 3.4; 3.5). Натомість введення ППГ супроводжувалось зменшенням чутливості вказаних судин до H_2S -індукованої вазодилатації, доказом чого є зміщення кривої «доза-ефект» праворуч по відношенню до такої

у тварин контрольної групи, а також вірогідне зростання EC_{50} H_2S для мезентеріальної артерій на 19,8 %, порівняно з контролем.

Таким чином дефіцит H_2S в СОШ, який виникає на тлі введення ППГ, зменшував «опірність» шлунку до дії агресивних чинників, що зіставлялось із зростанням інтенсивності окисної деструкції ліпідів та білків, розвитком дисбалансу в системі про-/антиоксидантів, порушенням продукції слизу, зміною фосфоліпідного спектру та проникності клітинних мембран, зменшенням продукції вазодилаторних простагландинів та нітроген монооксиду, а також зниженням чутливості стінки мезентеріальної артерії до вазодилаторної дії H_2S . Натомість введення донору H_2S покращувало захисний потенціал шлунку, що відображалось у його позитивному впливі на метаболічні процеси в СОШ - продукцію слизу, вазодилаторних молекул, стан про-/антиоксидантів, активність процесів пероксидації ліпідів та білків, фосфоліпідний спектр.

За внутрішньошлункового введення диклофенаку натрію встановлене вірогідне зменшення вмісту H_2S в сироватці крові (на 18,4%) (рис. 4.1, табл. 4.1). На тлі попереднього введення ППГ зменшення рівня H_2S було більш виразним (на 38,9 та 25,2 % порівняно з контролем та диклофенаком, відповідно, ($p < 0,05$)). Натомість попереднє введення $NaHS$ нівелювало зазначені зміни рівня H_2S , і повертало його вміст в сироватці крові практично до рівня інтактних тварин.

На тлі введення диклофенаку натрію у щурів спостерігались виразні макро- та мікроскопічні дефекти СОШ у вигляді виразок, ерозій та багатьох крововиливів, що супроводжувалися у більшості тварин здуттям шлунку, набряком з вираженою гіперемією, формуванням ділянок некрозу, порушенням складчастості, при макроскопічному дослідженні були знайдені у 100 % тварин (табл. 4.2; 4.3). Одна тварина в цій групі загинула внаслідок перфорації виразки. Зменшення вмісту H_2S , індуковане ППГ, значно погіршувало макроскопічну картину шлунку за умов введення диклофенаку: спостерігалось утворення значних за розміром виразок, які відрізнялися за формою, глибиною, а також супроводжувалися іншими порушеннями СОШ: гіперемією, набряком,

крапковими крововиливами, виразки були знайдені у 100 % тварин, перфорація і загибель спостерігались у 2 тварин з групи. Поряд з цим відмічалось достовірне зростання показників множинності, важкості виразкоутворення на 70,8 та 30,8 % і виразкового індексу в 1,6 разів, порівняно з групою тварин, які отримували лише диклофенаку.

За умов попереднього введення NaHS макроскопічні ознаки диклофенак-індукованої гастротоксичності були менш виразними. У цій групі щурів гіперемії та порушення складчастості СОШ не спостерігалось, а число геморагій, виразність здуття та набряку слизової достовірно зменшились у даній групі, порівняно з монотерапією диклофенаком. За цих умов множинність і важкість виразкоутворення були на 53,5 та 23,1 % менше, а виразковий індекс - в 1,8 рази меншим, ніж в групі II. Таким чином рівень H_2S в організмі суттєво впливає на виразність ульцерогенної дії диклофенаку натрію за макроскопічними змінами СОШ.

За 5-ти денного інтрагастрального введення донору H_2S відмічалось незначне зниження загальної кислотності шлункового соку (на 11,1 %, $p > 0,05$). За даними літератури H_2S виявляє дозозалежний антисекреторний ефект, що асоціюється зі зниженням секреції соляної кислоти та збільшення продукції бікарбонатів [133, 224]. За введення диклофенаку натрію недостовірно підвищувалася загальна кислотність шлункового соку, внаслідок його «кислотного» походження ($pH=4,0$) та парасимпатикоміметичної дії на ШКТ [4]. Комбіноване застосування диклофенаку натрію та H_2S практично не впливало на кислотність секрету шлунку (досліджуваний показник відрізнявся від контролю на 6,9 %).

Дослідження змін моторно-евакуаторної функції травного каналу (див. табл. 4.5) показало, що диклофенаку натрію притаманна здатність статистично вірогідно збільшувати моторику ШКТ (на 14,9 %) порівняно з контролем. Це співставляється з даними літератури та є одним з симптомів НПЗЗ-ентеропатії [4]. На противагу цьому, ізольоване введення натрій гідрогенсульфіду викликало (на 25,7 %) зниження моторики кишечника піддослідних тварин. В літературі описана пряма дозозалежна міорелаксуюча дія H_2S на рухову

активність кишечника, що реалізується через інгібування пропульсивної активності та підвищення амплітуди перистальтичних хвиль. Механізми міорелаксуючої дії H_2S можуть включати активацію фосфатази легких ланцюгів міозину, АТФ-чутливих калієвих каналів низької провідності, а також натрієвих каналів [155].

Одночасне 5-ти денне введення щурам $NaHS$ та диклофенаку в умовно терапевтичних дозах практично нівелювало зміни моторної функції кишечника тварин, які виникали під впливом монотерапії досліджуваними сполуками: довжина кишечника, пройдена контрастною речовиною в цій групі тварин практично не відрізнялась від групи контролю.

Отримані дані підтверджують виразну гастропротективну дію H_2S за умов диклофенак-індукованого ураження СОШ, молекулярні механізми якого залишаються до кінця нез'ясованими. Тому, в подальшому було проведене дослідження впливу різного рівня насиченості організму тварин H_2S на НПЗЗ-індуковані зміни біохімічних показників слизової шлунку.

Введення диклофенаку натрію супроводжувалось активацією вільнорадикального окиснення ліпідів та білків (табл. 4.6), про що доказово свідчить достовірне зростання вмісту малонового діальдегіду (на 23,3 %) та карбонільних груп протеїнів (на 20,7 %). Різний рівень H_2S в організмі змінював виразність активуючого впливу НПЗЗ на процеси окисної модифікації ліпідів та протеїнів. Застосування диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S значно збільшувало ступінь вільнорадикального окиснення: рівень МДА та КГП в СОШ достовірно (на 42,4 та 40,1 %, відповідно) перевищував показники у контрольній групі. Натомість введення диклофенаку натрію на тлі застосування екзогенного донору H_2S нормалізувало процеси перекисного окиснення ліпідів та білків: вміст МДА та КГП в СОШ статистично вірогідно не відрізнялись від такого у контрольній групі тварин.

Використання НПЗЗ супроводжувалося формуванням дисбалансу в системі про/антиоксидантів (табл. 4.7). На тлі введення диклофенаку натрію реєструвалось достовірне зростання активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази (на 20,6 %) та зниження активності антиоксидантного

ензиму супероксиддисмутази (на 17,6 %) в СОШ, порівняно з контролем. Застосування цього НПЗЗ на тлі дефіциту H_2S значно збільшувало масштабність пертурбацій в системі про-антиоксидантних ензимів: за цих умов виявлялося вірогідне збільшення (на 45,8 %) активності НАДФН-оксидази та зниження (на 31,9 %) активності СОД. За умов введення диклофенаку натрію та донору H_2S активність НАДФН-оксидази та СОД статистично достовірно не відрізнялись від показників у контрольній групі тварин.

Введення НПЗЗ змінювало фосфоліпідний спектр СОШ (див. табл. 4.8). Диклофенак натрію викликав зменшення вмісту ЗФ на 19,2 %, ФХ на 25,3 %, зростання рівня ФЕ на 21,9 % та ЛФХ на 24,2 %, а також зменшення співвідношення ФХ/ФЕ (на 38,8 %) і ФХ/ЛФХ (38,5 %). За умов застосування диклофенаку натрію та ППГ відмічались більш масштабні зміни у фосфоліпідному спектрі: зниження вмісту ЗФ, ФХ, ФХ/ФЕ та ФХ/ЛФХ становило 30,4; 39,0; 58,0 та 58,1 %, зростання рівнів ФЕ та ЛФХ становило відповідно 45,1 та 48,5 %. Натомість введення НПЗЗ на тлі застосування донора H_2S практично не впливало на стан фосфоліпідів в мембранах клітин СОШ.

Диклофенак натрію впливав на слизовий бар'єр СОШ, про що доказово свідчить вірогідне зниження вмісту ГАГ на 22,5 %, порівняно з контрольною групою тварин (рис. 4.2). Вплив цього НПЗЗ на утворення слизу досить тісно асоціюється з рівнем H_2S в організмі щурів. За умов введення диклофенаку натрію разом з ППГ падіння рівня глікозаміногліканів було більш виразним і становило 35,4 %, відносно показника контрольної групи тварин та 16,6 %, порівняно з показником в групі щурів, які отримували лише диклофенак натрію. Застосування цього НПЗЗ сумісно з $NaHS$ не викликало достовірних змін продукції слизу.

За оцінки впливу НПЗЗ на продукцію вазоактивних молекул, чутливість мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S та його зміни на тлі модулювання рівня H_2S визначено, що НПЗЗ чинить депримуєчий вплив на продукцію H_2S в СОШ (табл. 4.9). В групі тварин, які отримували диклофенак натрію відмічалось достовірне зменшення ($p < 0,05$) активності H_2S -продукуєчого ензиму ЦГЛ та вмісту H_2S відповідно на 23,6 та 21,7 %,

порівняно з контролем. Призначення диклофенаку натрію на тлі застосування NaHS достовірно не впливало на продукцію H_2S . Водночас використання цього НПЗЗ разом з ППГ збільшувало масштабність змін синтезу H_2S в СОШ: активність ЦГЛ та рівень H_2S були відповідно на 20,9 та 22,7 % меншими, ніж в групі тварин, які отримували лише диклофенак.

Ще однією молекулою, яка бере участь в регуляції тонусу мезентеріальних судин є нітроген монооксид, що було обґрунтуванням для оцінки сумарної активності NO-синтази та загального вмісту нітратів і нітритів в СОШ за умов введення НПЗЗ на тлі різного рівня H_2S в організмі (див. табл. 4.10). Дослідження показали, що застосування диклофенаку натрію супроводжувалося достовірним зменшенням сумарної активності NO-синтази та вмісту $NO_2^- + NO_3^-$ в СОШ на 23,9 та 20,7 % відповідно, що співставляється з даними літератури [28, 29, 30, 55, 57]. Натомість сумісне введення донору H_2S та НПЗЗ наближало досліджувані показники системи NO-синтаза/NO до рівня контрольної групи тварин. Створення дефіциту H_2S за допомогою ППГ суттєво потенціювало інгібуючий вплив диклофенаку на сумарну активність NO-синтази: за цих умов її активність була на 40,6 % меншою, порівняно з контролем.

Подібна тенденція була відмічена при дослідженні активності простагландин-Н-синтетази (рис. 4.3). Отримані дані засвідчили, що введення щурам диклофенаку натрію призводило до зменшення активності простагландин-Н-синтетази на 16,9 % в порівнянні з контролем. Додаткове введення NaHS практично відновлювало активність цього ензиму до його рівня у контрольних щурів. Застосування диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S супроводжувалося більш виразним падінням активності простагландин-Н-синтетази: активність цього ензиму була на 33,8 % меншою, ніж в контролі, та на 20,3 %, порівняно з ізольованим введенням диклофенаком.

Застосування диклофенаку натрію зменшувало чутливість мезентеріальних артерії до дії H_2S (рис. 4.4, 4.5): відмічалось зміщення кривої «доза-ефект» праворуч та достовірно (на 27,5 %) підвищувалась EC_{50} (H_2S). Сумісне застосування диклофенаку натрію разом з донором H_2S відновлювало

чутливість мезентеріальних судин до вазорелаксуючої дії H_2S : крива «доза-ефект» наближалась до такої в групі тварин, які отримували лише НПЗЗ; показник EC_{50} (H_2S) достовірно не відрізнявся від контролю. Натомість введення ППГ разом з диклофенаком призводило до більш виразного зменшення H_2S -індукованої вазорелаксації: крива «доза-ефект» зміщувалась праворуч відносно такої в групі тварин, які отримували лише НПЗЗ; показник EC_{50} (H_2S) був достовірно більшим, ніж за умов ізолюваного введення диклофенаку.

Проведені дослідження підтвердили деякі молекулярні механізми, через які реалізується модулюючий вплив різного рівня H_2S на гастротоксичний потенціал НПЗЗ. Виявилося, що застосування диклофенаку на тлі дефіциту H_2S значно потенціює негативний вплив цього НПЗЗ на процеси пероксидації ліпідів та білків, продукцію слизу, фосфоліпідний спектр мембран клітин СОШ, продукцію вазодилаторних молекул. Водночас введення диклофенаку натрію на тлі застосування донору H_2S по більшій мірі нівелює негативний вплив НПЗЗ на вказані метаболічні процеси в СОШ. Серед можливих молекулярних механізмів, через які реалізується здатність H_2S попереджувати НПЗЗ-індуковану вазоконстрикцію, можна виділити наступні: прямий стимулюючий вплив H_2S на активність NO-синтази [144]; не виключено безпосередній активуючий вплив H_2S , або надлишку NO на PGH-синтазну активність; зменшення окиснювальної модифікації активних центрів редокс-чутливих протеїнів - NO-синтази та PGH-синтази, що асоціюється з антиоксидантною дією H_2S [238].

Проведений персентильний та кореляційний аналізи надав додаткові докази причетності H_2S в реалізації гастротоксичної дії диклофенаку. А саме, чим вища насиченість організму щурів H_2S , тим менший пошкоджуючий вплив диклофенаку на шлунок, і, навпаки, з низькою концентрацією H_2S асоціюється зростання гастротоксичності НПЗЗ (табл. 6.1).

Звертає на себе увагу, що множинність і важкість виразкоутворення, яке викликав диклофенак, обернено корелювали з рівнем H_2S . Введення цього НПЗЗ у щурів в групі 1, де рівень H_2S був найнижчим, викликало найбільш

виразне ушкодження СОШ. Тоді як в групі 2, де рівень H_2S був на 32,3 % нижчим, множинність і важкість ураження зменшувались, відповідно на 42,9 та 37,3 %, а в групі 3, де вміст цього газотрансміттера був найвищим, ці показники були на 85,6 і 55,5 % нижчими, ніж в групі 1.

Таблиця 6.1.

Зв'язок стану СОШ з вмістом H_2S в сироватці крові у щурів, які отримували диклофенак

Показники СОШ	Ранжування тварин за вмістом H_2S в сироватці крові			Кореляції з рівнем H_2S в сироватці крові
	Група 1	Група 2	Група 3	
	0-25 персентиль, n=8	25-75 персентиль, n=14	75-100 персентиль, n=8	
1	2	3	4	5
Вміст H_2S в сироватці крові, мкмоль/л	43,3±1,70	57,3±1,18*	72,0±2,36*#	
К-сть виразок на одну тварину	23,5±4,23	13,4±1,53*	3,38±1,03*#	-0,64*
Важкість ураження шлунку	2,36±0,48	1,18±0,03	1,05±0,19*#	-0,58*
МДА, нмоль/мг протеїна	9,53±0,27	8,15±0,31*	6,73±0,36*#	-0,57*
КГП, нмоль/мг протеїна	3,22±0,16	2,85±0,11	2,38±0,14*#	-0,55*
НАДФН-оксидаза, нмоль /хв. на 1 мг протеїна	1,55±0,08	1,33±0,06*	1,03±0,04*#	-0,52
СОД, ум.од/мг протеїна	1,23±0,07	1,49±0,05*	1,77±0,07*#	0,60*
ФХ, мкг/мг протеїна	64,9±4,54	86,2±4,23*	106±4,83*#	0,47*
ФЕ, мкг/мг протеїна	86,9±4,92	75,7±3,33	59,9±4,05*#	-0,45*
ФХ/ФЕ	0,775±0,08	1,19±0,10*	1,85±0,19*#	0,49*
ЛФХ, мкг/мг протеїна	24,6±1,57	21,6±1,08	17,0±1,24*#	-0,43*
ФХ/ЛФХ	2,76±0,31	4,23±0,41*	6,60±0,76*#	0,47*
ГАГ, мг/г тканини	2,61±0,09	3,27±0,14*	4,08±0,13*#	0,53*
$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, нмоль/мг протеїна	0,718±0,034	0,817±0,027*	1,052±0,04*#	0,59*
НО-синтаза, пмоль/хв. на 1 мг протеїна	0,838±0,035	1,21±0,07*	1,55±0,07*#	0,58*
РГН-синтаза, нмоль/хв. на 1 мг протеїна	2,33±0,13	3,23±0,11*	3,90±0,16*#	0,60*

1	2	3	4	5
H ₂ S, нмоль/мг протеїна	0,991±0,033	1,19±0,04*	1,51±0,07*#	0,76*
ЦГЛ, нмоль/хв. на 1 мг протеїна	0,079±0,004	0,110±0,006*	0,138±0,004*#	0,74*

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p<0,05$) відносно 0-25 персентиля;
2. # - статистично вірогідні відмінності ($p<0,05$) відносно 25-75 персентиля.

Результати, наведені в таблиці 6.1. показали чіткі докази тісного зв'язку між функцією шлунково-кишкового тракту та рівнем H₂S і підтвердив наявність гастропротекторного ефекту H₂S за умов дії диклофенаку натрію. Високий рівень H₂S в сироватці крові у тварин асоціювався з мінімальною пошкоджуючою дією препарату на ШКТ, а низький рівень цього газотрансміттера – навпаки, асоціюється з посиленням гастротоксичності диклофенаку. Так, вміст H₂S виявив обернені кореляційні зв'язки з активністю ферментів-продуцентів активних форм кисню та продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів та прямі – з показниками антиоксидантного захисту. При цьому в групі 3, де вміст H₂S був найвищим, активність МДА, КГП та НАФН-оксидази була на 29,4, 26,1 та 33,5 % ($p<0,05$) нижче, ніж в групі 1 з низьким вмістом H₂S. Натомість активність основного ферменту антиоксидантного захисту - супероксиддисмутази – навпаки, зростала із збільшенням вмісту H₂S (цей показник в групі 2 на 21,1 %, а в групі 3 – на 43,9 % вірогідно перевищував такий в групі 1). Нами також показано, що захисна дія H₂S в умовах диклофенак-індукованої гастропатії може бути наслідком його позитивного впливу на продукцію шлункового слизу. Так, вміст H₂S прямо корелював з вмістом ГАГ ($r=0,53$, $p<0,05$), після введення диклофенаку натрію в групі 3, де рівень H₂S був найвищим, рівень ГАГ залишався на 56,3 % більшим, ніж у щурів з низьким показником H₂S. Крім того, аналіз змін фосфоліпідного складу

клітинних мембран СОШ на тлі дії диклофенаку виявив, що рівень цього нейромедіатора має пряму кореляцію з показниками цілісності клітинних мембран – фосфатидилхоліном ($r=0,47$, $p<0,05$) та негативно – з продуктом деградації фосфоліпідів – лізофосфатидилхоліном та фосфатидилетаноламіном ($r=-0,43$ та $-0,45$, відповідно, $p<0,05$). Показники ФХ/ФЕ та ФХ/ЛФХ в групі тварин з високим вмістом H_2S в крові були вірогідно (на 138,7 та 139 %, $p<0,05$) вищими, ніж у тварин 1-ї групи.

Водночас слід відмітити, що продукція вазодилатуючих молекул та її зміни під впливом досліджуваного НПЗЗ в значній мірі корелює з рівнем H_2S . Про це доказово свідчать прямі кореляційні зв'язки між H_2S та NO-синтазою ($r=0,58$, $p<0,05$), PGH-синтазою ($r=0,60$, $p<0,05$), ЦГЛ ($r=0,74$, $p<0,05$) та вмістом H_2S в СОШ ($r=0,76$, $p<0,05$). Зазначені показники в групі з 1 з найнижчим рівнем H_2S були на 44,4, 38,6, 39,2 та 20,0 % нижче, ніж в групі 3 ($p<0,05$).

Наші результати свідчать, що низький рівень насиченості організму щурів H_2S погіршував ступінь враження ШКТ, тоді як високий рівень H_2S є чинником, що протидіє токсичним впливам диклофенаку натрію на ШКТ, а механізм його протекторної дії, як свідчать наші дані, може бути пов'язаний не тільки з позитивним впливом на продукцію NO, вазодилатуючих простагландинів та H_2S в СОШ, але і стимулюючим впливом на продукцію активних форм кисню.

В механізмах НПЗЗ-індукованої гастропатії окрім описаних вище, важливе місце займає здатність активувати загибель клітин епітелію слизової оболонки шлунку як шляхом некрозу, так і апоптозу [164, 253, 254]. Експерименти на культурах клітин слизової СОШ щурів та морських свинок [249, 250, 251] показали, що НПЗЗ індукують апоптоз шляхом прямого впливу на клітини. В дослідженні [252] НПЗЗ-індуковані механізми загибелі клітин (як некроз, так і апоптоз), викликали як неселективні, так і селективні інгібітори ЦОГ-2, за винятком рофекоксибу, і ця їх здатність не зменшувалась при екзогенному введенні простагландину E_2 , що свідчить про ЦОГ-2 незалежні механізми цитотоксичності. Болюсне введення НПЗЗ щурам також провокує

розвиток апоптозу шляхом TNF- α -опосередкованого механізму [254]. В подальшому посилення процесів апоптозу в СОШ на тлі застосування НПЗЗ було зареєстровано також і у людей [255]. Фрагментація ДНК, конденсація ядер та підвищення активності каспаз (каспаза-3, -8 і -9, та ін.) [256], можуть бути використані в якості індикаторів апоптозу, тоді як некроз може бути оцінений при наявності вивільнення таких ферментів як лактатдегідрогеназа та кисла фосфатаза.

Переважає більшість цих досліджень виконана *in vitro* (на культурах клітин). Така модель, безперечно, наближена до природніх умов, проте нам здалось доцільним провести експеримент і отримати матеріал для цитометричних досліджень *in vivo*, коли забір зразків проводився безпосередньо з шлунку тварини і відразу піддавався відповідній обробці та подальшому дослідженню.

Наші результати засвідчили (див. розділ 4), що диклофенак натрію в умовнотерапевтичній дозі при внутрішньошлунковому введенні викликає суттєві дистрофічно-дегенеративні зміни в СОШ, і одну з головних ролей в цьому процесі відіграє стимуляція процесів апоптозу на тлі розбалансування процесів регенерації слизової оболонки. На користь цього свідчило вірогідно вищий порівняно з щурами контрольної групи показник кількості клітинних подій в інтервалі G0G1 (в 2,43 рази, $p < 0,05$), зменшення відсотку клітин СОШ що перебувають в фазі синтезу ДНК (S-фазі) (в 1,8 рази, $p < 0,05$) з одночасним збільшенням в 1,3 рази кількості клітин з вмістом ДНК=4с, тобто таких, що перебувають в фазі G2+M. Така затримка у фазі G2 + M, на нашу думку, може бути пов'язана з певною блокадою мітозів на фоні дії диклофенаку натрію. Про затримку проліферації також свідчить і виявлене нами достовірно менше (у 2,3 рази, $p < 0,05$), порівняно з контрольною групою тварин, середнє значення показнику блоку проліферації клітин СОШ щурів, яким вводили диклофенак натрію. Виявлене нами «розбалансування» між фазами синтезу та затримки мітозів (фази S та G2 + M) на фоні застосування диклофенаку натрію, можливо, лежить в основі механізму гастротоксичної дії цього препарату.

Спираючись на результати попередніх досліджень, які довели, що надлишок H_2S в організмі здатний підвищувати захисні властивості шлунку та убезпечувати фармакотерапію НПЗЗ, було досліджено, як буде змінюватись негативна дія на клітинний цикл та показники апоптозу диклофенаку натрію за умов додаткового введення донору H_2S . Крім того, оцінено, чи впливає монотерапія натрію H_2S , взятим в умовнотерапевтичній дозі, на показники фрагментації ДНК в СОШ та інші досліджувані в цьому досліді параметри.

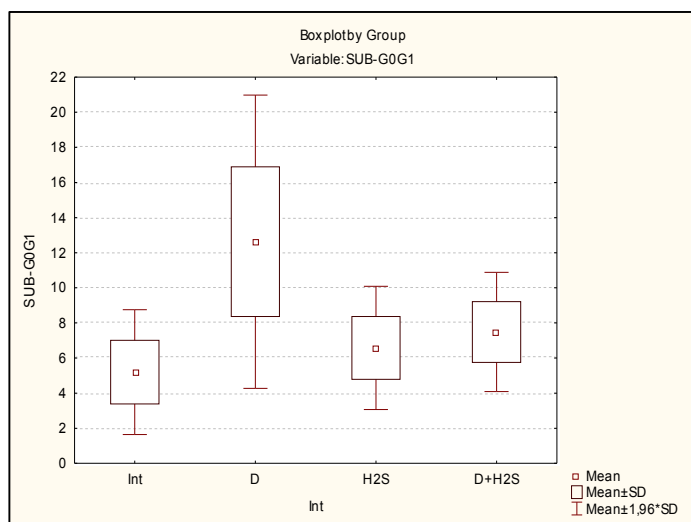
Результати (див. розділ 3 та розділ 4) показали, що самостійне введення піддослідним щурам NaHS практично не впливало на показники клітинного циклу слизової оболонки шлунку щурів. Так, не було встановлено статистично значущих відмінностей в числі клітинних подій в фазі G0G1 ($p > 0,05$), S фазі ($p > 0,05$), а також G2+M ($p > 0,05$). Слід відзначити, що за нашими даними в групі тварин, які отримували NaHS зареєстровано невелике зростання числа подій в інтервалі SUB-G0G1, порівняно з контрольними тваринами, проте це підвищення не сягало статистично вірогідних значень ($p > 0,05$), тому розцінюється нами як тенденція. Ці результати не повною мірою співпадають з описаними в літературі даними щодо анти-апоптотичні та про-апоптотичні властивості H_2S , в тому числі і щодо слизової оболонки шлунку [258, 259, 260]. Однак, слід зауважити, що здатність донора H_2S , S-пропаргіл-цистеїну стимулювати процеси апоптозу, проявлялась на моделі культури клітин раку шлунку, і супроводжувалось підвищенням експресії антиапоптотичних генів (p53 та Bax) в пухлині та її клітинах [258]. Натомість антиапоптотична дія H_2S була зареєстрована іншими авторами [259, 260], які показали, що прекодиціювання культури клітин СОШ з донором H_2S – NaHS дозозалежно попереджало апоптоз клітин шлунку, викликаний ішемією-реперфузією. Такий ефект спостерігався і при ендогенній гіперпродукції H_2S . В механізмах його дії лежить здатність зменшувати індуковані ішемією-реперфузією фосфорилування c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)-mitogen-activated protein kinase (MAPK) і активацію NF- κ B. H_2S також індукував s-сульфгідрилювання Keap1, та подальшу дизасоціацію Keap1/Nrf2 та активацію Nrf2. H_2S виявляв

захисну дію через виведення вільних радикалів кисню, інгібування p38 та JNK-залежного апоптозу клітин та NF-κB-залежного процесу запалення.

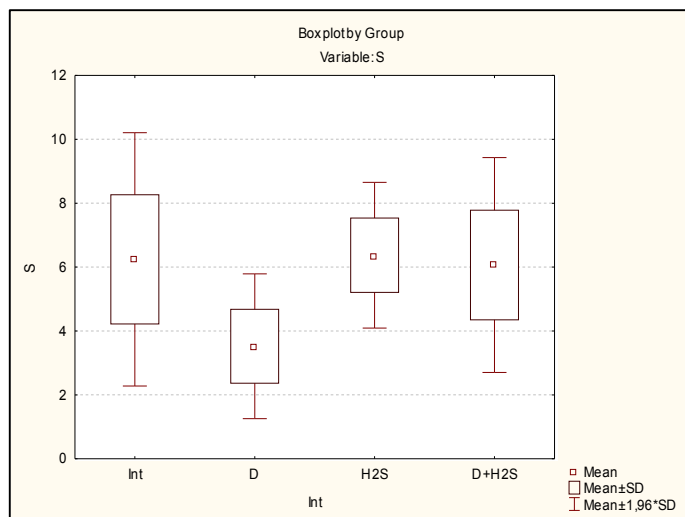
Ми вважаємо, що така «апоптоз-нейтральна» позиція H_2S за наших умов експерименту може бути пояснена тим, що NaHS вводили щурам без модельованої патології, причому доза його була досить низькою (5 % від LD_{50}), підвищення рівня його в організмі не перевершувало порогу токсичності. Крім того, на користь безпечності H_2S щодо шлунку інтактних тварин говорить не тільки відсутність впливу на процеси фрагментації ДНК, але і стабільність інших параметрів клітинного циклу. Слід звернути увагу, що описані в літературі впливи H_2S на процеси апоптозу в шлунку та інших органах зазвичай проявлялись за умов патології.

Підтвердження цієї гіпотези ми отримали при введенні диклофенаку натрію разом з H_2S . В цій групі щурів негативний вплив досліджуваного НПЗЗ на показники клітинного циклу СОШ був вірогідно ($p < 0,05$) меншим, а саме: була виявлена антиапоптотична дія: в 1,68 рази менша кількість клітинних подій в фазі G_0G_1 , в 1,7 рази більший середній показник S фази, майже на третину більша кількість клітин перебували у фазі G_2+M , а показник блоку проліферації зріс в 2,5 рази, порівняно з монотерапією диклофенаком. Ці параметри практично наближались до таких у тварин контрольної групи (рис.6.1).

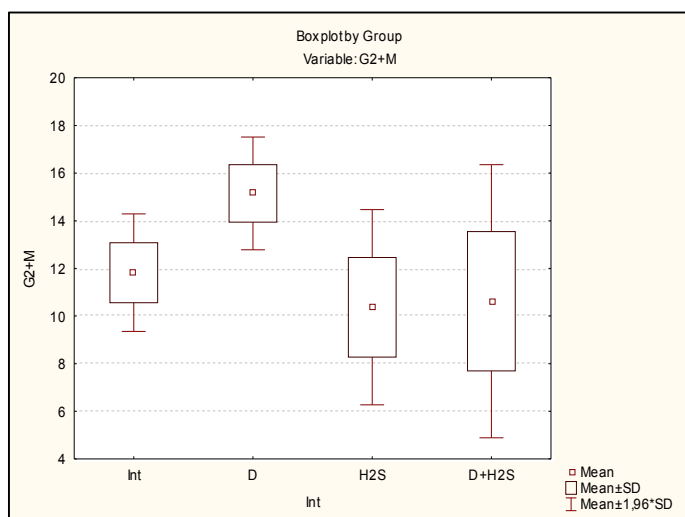
Тобто, підвищення вмісту H_2S виявило виражений коригуючий вплив на негативні зміни клітинного циклу та показники ДНК-грами щурів під впливом диклофенаку натрію.



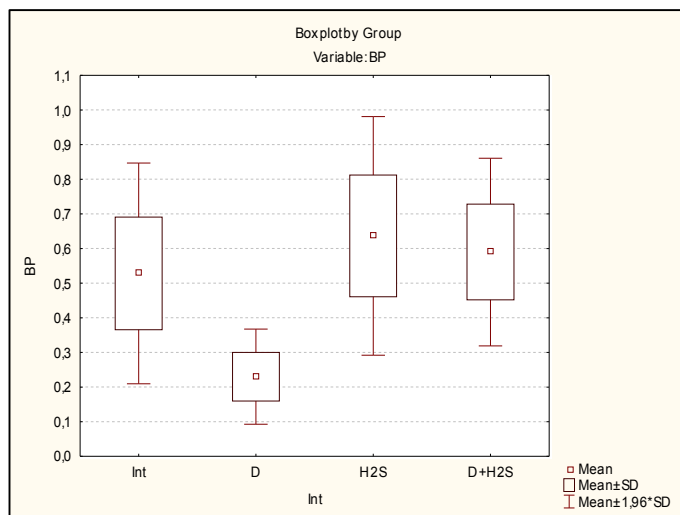
А



Б



В



Г

Рис. 6.1 Динаміка показників клітинного циклу слизової оболонки шлунку щурів на тлі введення натрію гідрогенсульфіду, диклофенаку натрію та їх комбінації. А – показники фрагментації ДНК (фаза sub G0G1); Б - фаза синтезу ДНК (S-фаза); В – фаза G2+M; Г – блок проліферації (співвідношення S/(G2+M)).

На основі власних результатів досліджень та даних літератури створена схема ймовірних біохімічних механізмів диклофенак-індукованої гастротоксичності та молекулярні мішені гастропротекторної дії H_2S (рис. 6.2)

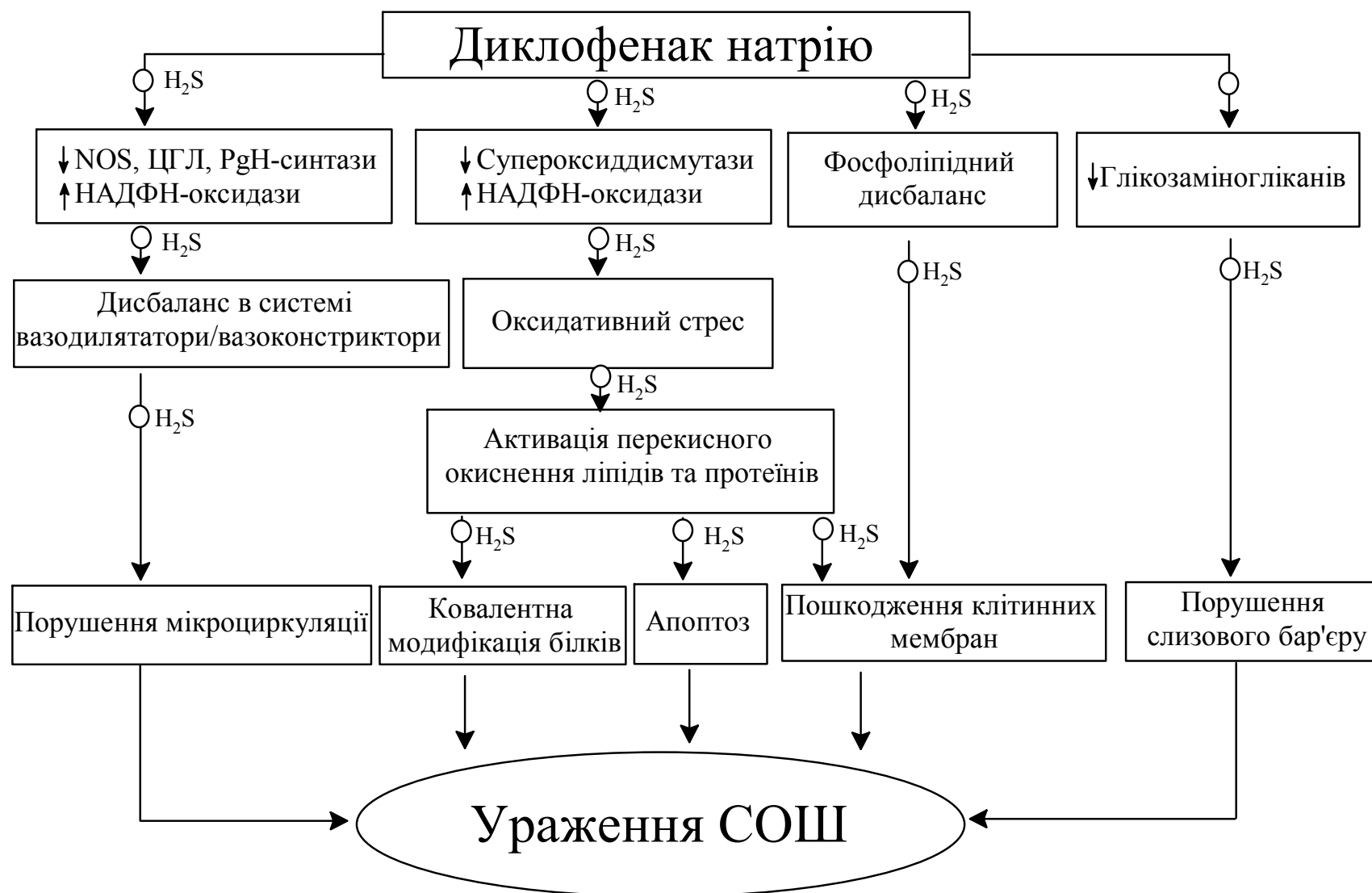


Рис. 6.2. Ймовірні біохімічні механізми диклофенак-індукованої гастротоксичності та молекулярні мішені гастропротекторної дії H_2S . Примітка. $\circ$ - молекулярні мішені дії донору H_2S .

Таким чином, проведені дослідження переконливо засвідчили, що вміст H_2S в організмі суттєво змінювало захисний потенціал СОШ, що проявлялось на всіх рівнях його захисту - як передепітеліальному, так і епітеліальному та постепітеліальному. При цьому було виявлено, що саме збільшення вмісту H_2S чинить захисну дію на шлунок та збільшувало здатність «опиратись» шкідливому впливу різних чинників, наприклад, нестероїдних протизапальних засобів. Постає питання щодо впливу різного рівня насиченості організму H_2S на основні фармакологічні ефекти НПЗЗ. В літературі зустрічаються поодинокі відомості про участь H_2S в модулюванні запального процесу і перцепції, проте це питання залишається до кінця не з'ясованим, оскільки дані літератури у багатьох питаннях суперечать один одному [33, 98, 229]. Тому оцінка наявності протизапального та знеболюючого ефектів у донору H_2S та інгібітору його синтезу, а також їх вплив на базові фармакологічні ефекти диклофенаку натрію, є важливими питаннями з огляду на можливість оптимізації фармакотерапії патологічних станів запального генезу.

Інгібітор синтезу H_2S ППГ практично не впливав на прояви ноціцептивної реакції та запального процесу у піддослідних тварин, а також не виявив значущого впливу на базові фармакологічні ефекти НПЗЗ. Водночас донор H_2S при 5-ти денному введенні в умовно терапевтичній дозі ($1/20 LD_{50}$) щурам викликав слабку аналгетичну дію у інтактних тварин і статистично значимий антиноціцептивний ефект в умовах асептичного запалення (формалінового тесту). На моделях запальних процесів (формалінового і карагенінового набряку) у мишей і щурів, відповідно, донор H_2S викликав виразну антиексудативну дію.

З'ясувалось, що $NaHS$ вірогідно збільшував антиноціцептивну дію диклофенаку натрію як на моделі електричного подразнення у щурів, так і в запальній фазі формалінового тесту. Водночас, попереднє введення $NaHS$ істотно посилювало протизапальний ефект диклофенаку натрію в умовах простагландин-індукованого запального процесу (карагенінового і формалінового набряків). Виявлена нами протизапальна та знеболююча дії H_2S

співставляються з механізмами дії диклофенаку натрію та мають синергічний вплив на його протизапальний і антиноцицептивний ефекти. Крім того, не виключено існування також і інших механізмів терапевтичної дії цієї біологічно активної молекули на прояви запального процесу та перцепцію, зокрема, зменшення продукції прозапальних цитокінів, вмісту цАМФ, модуляції NMDA-рецепторів, впливу на потенціал-залежні К-АТФ канали тощо [231, 232, 233, 234].

Таким чином, підвищення вмісту в організмі H_2S , в тому числі екзогенне введення його донору, не тільки попереджувало розвиток диклофенак-індукованої гастропатії, а й посилювало протизапальний та знеболюючий ефекти цього НПЗЗ.

ВИСНОВКИ

НПЗЗ зумовлюють 48,7% всіх побічних ефектів фармакотерапії, з них більше 90,0 % відноситься до ускладнень з боку ШКТ. Однією з основних ланок у патогенезі розвитку НПЗЗ-гастропатії є дисбаланс у співвідношенні вазоконстрикторів та вазодилататорів. Залишається невідомим, в якій мірі гастротоксичність НПЗЗ реалізується через вплив на систему продукції вазоактивного медіатора H_2S . Подальше поглиблене вивчення ролі H_2S в якості модулятора гастротоксичної дії та фармакодинамічного профілю НПЗЗ дозволить окреслити нові підходи до зменшення гастротоксичності цього класу лікарських засобів.

1. Донор H_2S в умовно терапевтичних дозах ($1/20 LD_{50}$) за різних шляхів введення, що становлять для мишей - 3 мг/кг (в/оч), для щурів - 1,5 мг/кг (в/оч) та 4 мг/кг (в/шл) не впливав на показник гострої токсичності диклофенаку натрію за умов в/оч введення щурам. LD_{50} досліджуваного НПЗЗ при його самотійному введенні становила 85,8 ($78,2 \div 93,3$) мг/кг, а при введенні разом з NaHS цей параметр дорівнював 96,3 ($89,0 \div 103,6$) мг/кг.

2. Вміст H_2S в організмі суттєво модулював ступінь гастротоксичності диклофенаку натрію: дефіцит H_2S – збільшував, тоді як надлишок його - навпаки, зменшував пошкоджуючий вплив досліджуваного НПЗЗ на шлунок. В/шл введення донору H_2S протягом 5 днів разом із диклофенаком натрію в умовно-терапевтичних дозах (4 мг/кг та 8 мг/кг) практично не впливало на секреторну та моторну функції травного тракту щурів та викликало вірогідно менші макроскопічні зміни в СОШ порівняно із монотерапією нестероїдним антифлогістиком. Введення щурам NaHS та ППГ протягом 5-ти днів не змінювало макроскопічної цілісності СОШ.

3. За умов введення диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S відмічались більш масштабні негативні зміни біохімічних маркерів СОШ, порівняно з монотерапією досліджуваним НПЗЗ: зниження продукції ГАГ становило 35,4 %, відносно контролю ($p < 0,05$), що на 16,6 % більше, порівняно з показником в

групі щурів, які отримували лише диклофенак; відмічено падіння вмісту загальних фосфоліпідів, фосфатидилхоліну на 30,4 та 39,0 % ($p < 0,05$) з одночасним зростанням рівнів фосфатидилетаноламіну та лізофосфатидилхоліну на 45,1 та 48,5 %, відповідно ($p < 0,05$), тоді як порушення цих параметрів відносно контролю на тлі введення одного диклофенаку становили 19,2, 25,3, 21,9 та 24,2 %, відповідно ($p < 0,05$). Дефіцит H_2S в організмі збільшував виразність пертурбацій в системі про- та антиоксидантного захисту, спричинених диклофенаком натрію, про що свідчить елевація вмісту МДК, КГП і активності НАДФН-оксидази в СОШ на 40-46 %, та падіння активності СОД на 31,9 % ($p < 0,05$), в той час як при монотерапії диклофенаком ці показники відрізнялись від контролю на 20-23 % та 17,6 %, відповідно ($p < 0,05$).

Створення надлишку H_2S запобігало негативній дії диклофенаку натрію на захисний потенціал шлунку та стан клітинних мембран, оскільки досліджувані показники достовірно не відрізнялись від параметрів контрольної групи.

4. Введення диклофенаку натрію на тлі дефіциту H_2S посилювало депримуєчий вплив досліджуваного НПЗЗ на продукцію вазоактивних молекул (зменшення активності PGH-синтази, NO-синтази та ЦГЛ в СОШ, вміст H_2S , нітритів та нітратів були на 20-22% ($p < 0,05$) більшими, ніж за монотерапії досліджуваним НПЗЗ. Це супроводжувалось більш виразним зменшенням чутливості мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S (EC_{50} збільшувалась на 55,3% порівняно з контролем проти 27,5% за умов введення одного диклофенаку натрію ($p < 0,05$). Застосування НПЗЗ на тлі надлишку H_2S запобігало негативному впливу диклофенаку на утворення NO, вазодилататорних простагландинів, H_2S в СОШ та процеси регуляції скоротливості мезентеріальних артерій за участі гідроген сульфіді. Введення донору H_2S супроводжувалось вірогідним збільшенням активностей PGH-синтази, NO-синтази, ЦГЛ та вмісту H_2S в СОШ (на 13-16% ($p < 0,05$), а також підвищенням чутливості мезентеріальної артерії до вазодилатуючої дії H_2S .

Введення ППГ, навпаки, зменшувало ензиматичну продукцію простагландинів, H_2S й NO , а також знижувало чутливість мезентеріальної артерії до вазорелаксуючої дії H_2S .

5. На тлі надлишку H_2S в організмі зміни клітинного циклу та проапоптотичний та антипроліферативний ефекти диклофенаку натрію були значно меншими в порівнянні з монотерапією досліджуваним НПЗЗ, про що свідчить зменшення середнього значення показника інтервалу SUB-G0G1 та показника фази G2+M, збільшення частки клітин, що перебувають в фазі синтезу ДНК (S фази), а також нормалізація показника блоку проліферації на тлі сумісного введення диклофенаку натрію з $NaHS$. Введення донору H_2S інтактним щурам не впливало на показники клітинного циклу та фрагментацію ДНК в СОШ.

6. За умов сумісного застосування диклофенаку натрію з донором H_2S зареєстровано посилення знеболюючої дії досліджуваного НПЗЗ на моделі електричного подразнення у щурів (ПБЧ на 4-й і 6-й годині збільшувався на 42,5 і 57,3% проти 36,5 і 30,7% при монотерапії, відповідно, ($p < 0,05$), а також формалінового тесту, про що свідчить достовірне збільшення (на 95,0%) тривалості латентного періоду II фази та зменшення (на 63,4%) в досліджуваній фазі часу больової реакції, що значно перевищує показники, отримані за монотерапії досліджуваним НПЗЗ на 29,3 і 39,7% ($p < 0,05$), відповідно. Прекондиціювання донором H_2S в 1,7 разів посилювало протизапальний ефект диклофенаку натрію на моделях карагенінового і формалінового набряків, тоді як ППГ не виявив значущого впливу на базові фармакологічні ефекти НПЗЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Каратеев А. Е. НПВП-ассоциированная патология верхних отделов ЖКТ: современные аспекты проблемы [Электронный ресурс] / А. Е. Каратеев. – 2009. – Режим доступа до ресурсу: <http://medi.ru/doc/g421512.htm>.
2. Каратеев А. Е. Модификация традиционных НПВП как метод повышения их безопасности и удобства применения / А. Е. Каратеев // РМЖ «Ревматология». – 2015. – № 7. – С. 392–399.
3. Антоненко А. В. Особливості перебігу гастропатії, індукованої застосуванням нестероїдних протизапальних препаратів у хворих на остеоартроз / А. В. Антоненко, Т. В. Берегова, А. С. Свінціцький // Український ревматологічний журнал. – 2014. – № 3. – С. 68–72.
4. Вікторов О. П. Проблеми та перспективи отримання інформації про побічні реакції, спричинені нестероїдними протизапальними препаратами, шляхом анонімного опитування пацієнтів (погляд на проблему) [Електронний ресурс] / О. П. Вікторов, О. В. Кашуба // Український медичний часопис. – 2010. Режим доступа: <http://www.health-ua.org/article/rpt/51.html>
5. Проценко Г. О. Порівняльні особливості побічних реакцій, спричинених нестероїдними протизапальними препаратами диклофенаком та німесулідом — проблема клінічної фармакології в ревматології / Г. О. Проценко, О. В. Кашуба // Український ревматологічний журнал. – 2011. – С. 1–9.
6. Moore R. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice / R. A. Moore, S. Derry, C. J. Phillips // BMC Musculoskeletal Disorders. – 2006. – Vol. 7. – P. 79-91.
7. Palileo C. Gastrointestinal defense mechanisms [Електронний ресурс] / C. Palileo, J. D. Kaunitz // Curr Opin Gastroenterol. – 2011. – Режим доступа до ресурсу: 10.1097/MOG.0b013e32834b3fcb

8. Gastrointestinal-sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence [Електронний ресурс] / R. Blackler, M. Bolla, S. Syer [et al.] // PLoS One. – 2012. – Режим доступу до ресурсу: e35196.
9. Бенца Т. М. Поражение пищеварительной системы нестероидными противовоспалительными препаратами [Електронний ресурс] / Т. М. Бенца // Рациональная фармакотерапия. – 2007. – № 5. – Режим доступу до журналу: <http://rpt.health-ua.com/article/67.html>.
10. Степанов Ю. М. Динамика содержания ЦОГ-2 в слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки на фоне медикаментозной коррекции НПВП-гастропатий / Ю. М. Степанов, Ю. С. Бреславец // Гастроентерологія. – 2013. – № 1. – С. 24–27.
11. Laine L. Assessment of upper gastrointestinal safety of etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomized comparison / L. Laine // Lancet. – 2007. – Vol. 9560. – P. 465–473.
12. Laporte J. Upper gastrointestinal bleeding associated with the use of NSAIDs / J. Laporte, L. Ibanez, X. Vidal // Drug. Saf. – 2010. – № 27. – P. 411–420.
13. Свинцицкий А. С. Гастродуоденальные осложнения противовоспалительной терапии в ревматологической практике / А. С. Свинцицкий, О. Г. Пузанова // Український ревматологічний журнал. – 2002. – № 2(8). – С. 15–23.
14. Каратеев А. Е. Шесть ножей в спину ингибиторам протонной помпы / А. Е. Каратеев. // Научно-практическая ревматология. – 2013. – № 51. – С. 32–34.
15. Карасёва Г. А. НПВП-индуцированная гастропатия: от понимания механизмов развития к разработке стратегии профилактики и лечения / Г. А. Карасёва // Журнал «Медицинские новости». – 2012. – № 8. – С. 21–26.

16. Targownik L. E. Gastroprotective strategies among NSAID users / L. E. Targownik, P. A. Thomson // *Can. Fam. Physician* – 2006. – Vol. 52. – P. 1100-1105.
17. Schjerning Olsen A. M. Impact of proton pump inhibitor treatment on gastrointestinal bleeding associated with non-steroidal anti-inflammatory drug use among post-myocardial infarction patients taking antithrombotics: nationwide study / A. M. Schjerning Olsen, J. Lindhardsen, G. H. Gislason // *British Medical Journal BMJ*. – 2015. – P. 351.
18. Becker R. C. COX-2 inhibitors / R. C. Becker // *Tex. Heart. Inst. J.* – 2005. – № 32. – С. 380.
19. Moodley I. Review of the cardiovascular safety of COXIBs compared to NSAIDS / I. Moodley // *Cardiovasc. J. Afr.* – 2008. – № 19. – С. 102–107.
20. The healing of NSAID-induced gastric lesion may be followed by small intestinal and cardiovascular side effects / L. P. Filaretova, T. R. Bagaeva, O. Y. Morozova, O. Y. Zelena // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – № 62. – С. 619–625.
21. Yang M. Network Meta-Analysis Comparing Relatively Selective COX-2 Inhibitors Versus Coxibs for the Prevention of NSAID-Induced Gastrointestinal Injury / M. Yang, H. Wang, M. Zhao // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – № 94. – С. 1592–1596.
22. Волощук Н. І. Оцінка протективної дії препаратів флавоноїдів та ізофлавоноїдів за умов НПЗЗ-гастропатії у щурів / Н. І. Волощук // *Вісник наукових досліджень*. – 2010. – № 1(58). – С. 80–84.
23. Чорноіван Н. Г. Нестероїдні антифлогістики: плюси та мінуси фармакологічних ефектів, шляхи їх оптимізації / Н. Г. Чорноіван // *Вісник Вінницького національного медичного університету*. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 159–163.
24. Журавлева М. В. Рациональное применение нестероидных противовоспалительных препаратов: баланс эффективности и безопасности [Електронний ресурс] / М. В. Журавлева // *Вестник семейной медицины*. – 2013. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.medi.ru/doc/g421539.htm>.

25. Ткач С. М. Современные подходы к профилактике и лечению НПВП-гастропатий / С. М. Ткач // Гастроэнтерология. – 2013, № 4 (50). – С. 96–102.
26. Higuchi K. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury / K. Higuchi, E. Umegaki, T. Watanabe // J. Gastroenterol. – 2009. – P. 879–888.
27. Wallace J. L. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-gastroenteropathy / J. L. Wallace // World J. Gastroenterol. – 2013. – № 19. – С. 1861–1876.
28. Tarnawski A. S. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target / A. S. Tarnawski, A. Ahluwalia, M. K. Jones // Curr. Med. Chem. – 2012. – № 19. – С. 4–15.
29. Kemmerly T. Gastroduodenal mucosal defense / T. Kemmerly, J. D. Kaunitz // Curr. Opin. Gastroenterol. – 2014. – № 30. – С. 583–588.
30. Wallace J. L. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way / J. L. Wallace, M. J. S. Miller // Gastroenterology. – 2000. – Vol. 119. – P. 512–520.
31. Coruzzi G. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond / G. Coruzzi, N. Venturi, S. Spaggiari // ACTA BIOMED. – 2007. – Vol. 78. – P. 96–110.
32. De Backer O. Mechanisms of relaxation by carbon monoxide-releasing molecule-2 in murine gastric fundus and jejunum / O. De Backer, R. A. Lefebvre // Eur. J. Pharmacol. – 2007. – Vol. 572, № 2–3. – P. 197–206.
33. Li L. Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation? / L. Li, M. Bhatia, P. K. Moore // Curr. Opin. Pharmacol. – 2006. – № 6. – С. 125–129.
34. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacological reports. – 2007. – Vol. 59. – P. 4–24.
35. Stuhlmeier K. M. NF-kappaB independent activation of a series of proinflammatory genes by hydrogen sulfide / K. M. Stuhlmeier, J. Bröll, B. Iliev // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2009. – № 234. – P. 1327–1338.

36. Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential / C. Szabó // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2007. – № 6. – С. 917–935.
37. Tan B. H. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system / B. H. Tan, P. T. Wong, J. S. Bian // *Neurochem. Int.* – 2010. – № 56. – С. 3–10.
38. Hydrogen sulfide ameliorates ischemia/reperfusion–induced hepatitis by inhibiting apoptosis and autophagy pathways / P. Cheng , F. Wang , K. Chen , C. Guo // *Mediators Inflamm.* – 2014. – P. 935–951.
39. Волощук Н. І. Статеві гормони як модулятори стану захисних систем слизової оболонки шлунку щурів / Н. І. Волощук // *Медична хімія*. – 2009. – Т. 11. – № 3. – С. 43–47.
40. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan–induced hindpaw oedema in the rat. / M. Bhatia, J. Sidhapuriwala, S. M. Mochhala, P. K. Moore // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 145. – P. 141–144.
41. Li L. Hydrogen sulfide and cell signaling / L. Li, P. Rose, P. K. Moore // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2011. – Vol. 51. – P. 169–187.
42. Fiorucci S. Hydrogen sulfide: from physiology to pharmacology / S. Fiorucci // *Inflamm. Allergy Drug Targets*. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 77–84.
43. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role / N. V. Zaichko, A. V. Melnik, M. M. Yoltukhivskyy [et al.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2014, – Vol. 86, № 5. – P. 5–25.
44. Ревматические болезни: номенклатура, классификация, стандарты диагностики и лечения / В. Н. Коваленко [и др.] // Киев. – 2002. – 215 с.
45. Викторів А. П. Побочное действие современных нестероидных противовоспалительных препаратов: проблемы остаются? / А. П. Викторів // *Український медичний часопис*. – 2003. – № 1 (33). – С. 79–89.
46. Safety and efficacy of oral nonsteroidal anti–inflammatory drugs in patients with rheumatoid arthritis : a six–month randomised study / W. Shi , Y. M. Wang , L. S Li [et al.] // *Clin. Drug. Investig.* – 2004. – Vol. 24, № 2. – P. 89–101.

47. Страчунский Л. С. Нестероидные противовоспалительные средства. Методическое пособие. [Электронный ресурс] / Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов // Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/rus/all/metod/npvs/npvs.shtml>
48. Логинов А. Ф. Нестероидная гастропатия: современные методы профилактики и лечения / А. Ф. Логинов // Гастроэнтерология. – 2011. – №3. – С. 10–16.
49. Борткевич О. П. Використання місцевих форм нестероїдних протизапальних засобів у ревматології / О. П. Борткевич, Ю. В. Белявська // Український терапевтичний журнал. – 2005. – № 3(7). – С. 96–101.
50. Анохина Г. А. Нестероидная противовоспалительная гастропатия, этиология, патогенез, классификация, клиника, диагностика и лечение [Электронный ресурс] / Г. А. Анохина. – 2015. – Электронный семинар. – Режим доступа: <http://med-obuch.kz/questionary/view/117.html#full>.
51. Листопад А. Современные нестероидные противовоспалительные средства на фармацевтическом рынке Украины [Электронный ресурс] / А. Листопад // Провизор. – 1999. – № 21. – Режим доступа: <http://www.provisor.com.ua/archive/1999/N21/listopad.php>.
52. Циммерман Я. С. Гастродуоденальные эрозивно–язвенные повреждения, индуцированные приемом НПВС / Я. С. Циммерман // Клин. мед. – 2008. – № 2. – С.14–19.
53. Конорев М. Р. Лечение и профилактика гастропатии, индуцированной нестероидными противовоспалительными препаратами / М. Р. Конорев // Медицинские новости. – 2006. – № 8, Т. 1. – С. 41–50.
54. Насонов Е. Л. Поражения желудка, связанные с приемом нестероидных противовоспалительных препаратов (часть 1) / Е. Л. Насонов, А. Е. Каратеев // Клиническая медицина. – 2000. – № 3. – С. 4–7.
55. Laine L. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside / L. Laine, K. Takeuchi, A. Tarnawski // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 135, № 1. – P. 41–60.

56. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation / T. Brzozowski, P. C. Konturek, S. J. Konturek [et al.] // Journal of physiology and pharmacology. – 2005. – Vol. 56, Supp 5. – P. 33–55.
57. Wallace J. L. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies / J. L. Wallace // Br. J. Pharmacol. – 2012. – Vol. 165, № 1. – P. 67–74.
58. Wallace J. L. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense / J. L. Wallace, P. R. Devchand // Br. J. Pharmacol. – 2005. – Vol. 145, № 3. – P. 275–282.
59. McCormack J. P. Digging for data from the COX-2 trials [letter] / J. P. McCormack, R. Rangno // CMAJ. – 2002. – Vol. 166. – P. 1649–1650.
60. Евсютина Ю. В. Гастропатия, индуцированная НПВП, – современные представления о механизмах развития, лечении и профилактике / Ю. В. Евсютина, А. С. Трухманов // Российский медицинский журнал. – 2014. – № 31. – С. 2214–2220.
61. COX inhibition and NSAID-induced gastric damage-roles in various pathogenic events / Tokeuchi K., Tonoka A., Honyoshi Y. et al. // Curr. Top. Med. Chem. – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 475–486.
62. Hawkey C. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy / C. J. Hawkey // Gastroenterology. – 2000. – Vol. 119. – P. 521–535.
63. Каратеев А. Е. Распространенность, структура и факторы риска развития гастропатий, индуцированных нестероидными противовоспалительными препаратами / А. Е. Каратеев, В. А. Насонова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – № 4. – С. 34–39.
64. Насонов Е. Л. НПВП при ревматических заболеваниях / Е. Л. Насонов // Ревматология. – 2002. – № 1. – С. 38–44.
65. Aalykke C. Epidemiology of NSAID-related gastroduodenal mucosal injury / C. Aalykke, K. Lauritsen // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 15. – P. 705–722.

66. Подплетняя Е. А. Механизмы гастродуоденотоксичности нестероидных противовоспалительных средств / Е. А. Подплетняя, В. И. Мамчур // Журнал АМН Украины. – 2005. – Т. 11, № 1. – С. 47–62.
67. Каратеев А. Е. Лечение и медикаментозная профилактика НПВП-гастропатии: основные положения // Фарматека. – 2006. – № 6. – С. 37–45.
68. Ушкалова Е. А. Внутривенные ингибиторы протонной помпы в лечении кровотечений из верхних отделов желудочно-кишечного тракта / Е. А. Ушкалова // Трудный пациент. – 2005. – № 10–11. – С. 32–37.
69. Проценко Г. О. Безпечність застосування НПЗП в ревматологічній практиці / Г. О. Проценко // Пактикуючий лікар. – 2013. – № 4. – С. 22–25.
70. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis / C. Bombardier, L. Lane, A. Reicin [et al.] // New Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 343. – P. 1520–1528.
71. Mukherjee D. Risk of cardiovascular events associated with selective COX 2 inhibitors / D. Mukherjee, S. E. Nissen, E. J. Topol // JAMA. – 2001. – Vol. 286. – P. 954–959.
72. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials / N. Bhala, J. Emberson, A. Merhi [et al.] // Lancet. – 2013. – Vol. 382. – P. 769–779.
73. Зборовская И. Л. Гастропатии, индуцированные нестероидными противовоспалительными препаратами: клиническое значение, лечение, профилактика / Метод. пособие для практ. врачей. – Волгоград. – 2005. – 16 с.
74. Свінціцький А. С. Гастропатії, зумовлені нестероїдними протизапальними препаратами: сучасний погляд на проблему [Електронний ресурс] / А. С. Свінціцький // Новості медицини і фармації. Гастроентерологія. – 2008. – № 239. – Режим доступу: <http://www.mif-ua.com/archive/article/4842>.
75. Prophylaxis of nonsteroidal antiinflammatory drug gastropathy: a clinical opinion / S. H. Roth, J. F. Fries, I.A. Abadi [et al.] // J. Rheumatol. – 1991. – Vol. 18, № 7. – P. 956–958.

76. Lazzaroni M. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy: clinical results with H₂ antagonists and proton pump inhibitors / M. Lazzaroni G. Bianchi Porro // Ital. J. Gastroenterol. Hepatol. – 1999. – Vol. 31, Suppl. 1. – P.73–78.
77. Malagelada J. Sucralfate therapy in NSAID bleeding gastropathy / J. Malagelada, A. Rodriques de la Serna, H. Dammann // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2003. – Vol. 1. – P. 51–56.
78. Журавлева Л. В. НПВС-ассоциированные гастропатии в практике терапевта: пути профилактики и лечения с позиции доказательной медицины / Л. В. Журавлева, Н. А. Лопина // Ліки України. – 2011. – № 1 (147). – С. 43–47.
79. Jackson M. R. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite / M. R. Jackson, S. L. Melideo, M. S. Jorns // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51, № 34. – P. 6804–6815.
80. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production and functions / H. Kimura // Exp. Physiol. – 2011. – Vol. 96, № 9. – P. 833–835.
81. Abe K. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator / K. Abe, H. Kimura // J. Neurosci. – 1996. – Vol. 16, № 3. – P.1066–1071.
82. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // FASEB J. – 2002. – Vol. 16. – P. 1792–1798.
83. Мясоедова О. А. Роль сероводорода в реализации физиологических функций организма / О. А. Мясоедова, В. И. Коржов // Журн. НАМН України. – 2011. – Том 17, № 3. – С. 191–200.
84. Gadalla M. M. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter / M. M. Gadalla, S. H. Snyder // J. Neurochem. – 2010. – Vol. 113. – P.14–26.
85. Solubility and Permeation of Hydrogen Sulfide in Lipid Membranes [Електронний ресурс] / E. Cuevasanta, A. Denicola, B. Alvarez [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 1. – Режим доступа: <http://www.plosone.org/article/info>.

86. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide / N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura [et al.] // J. Biochem. – 2009. – Vol. 146, № 5. – P. 623–626.
87. Shibuya N. Production of hydrogen sulfide from d-cysteine and its therapeutic potential [Електронний ресурс] / N. Shibuya, H. Kimura // Front Endocrinol (Lausanne). – 2013. – Vol. 16. – Режим доступу: http://www.frontiersin.org/experimental_endocrinology/.
88. Визначення вмісту гідроген сульфїду в сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісник наукових досліджень. – 2009. – № 1. – С. 29–32.
89. Заїчко Н. В. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфїду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази / Н. В. Заїчко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – № 4. – С. 35–41.
90. Changes of the new gaseous transmitter H₂S in patients with coronary heart disease / H. L. Jiang, H. C. Wu, Z. L. Li [et al.] // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. – 2005. – Vol. 25. – P. 951–954.
91. Du J. Endogenous H₂S is involved in the development of spontaneous hypertension / J. Du, H. Yan, C. Tang // Beijing Da Xue Xue Bao. – 2003. – Vol. 35. – P. 102.
92. Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury / M. Bhatia // FASEB J. – 2005. – Vol. 19. – P. 623–625.
93. Sivarajah A. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat / A. Sivaraja, M. C. McDonald, C. Thiernemann // Shock. – 2006. – Vol. 26. – P. 154–161.
94. Zhu Y. Z. Hydrogen sulfide and its cardioprotective effects in myocardial ischemia in experimental rats / Y. Z. Zhu // J. Appl. Physiol. – 2007. – Vol. 102. – P. 261–268.

95. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes / T. T. Pan, Z. N. Feng, S. W. Lee [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2006. – Vol. 40. – P. 119–130.
96. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage / K. Qu, C. P. Chen, B. Halliwell [et al.] // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37. – P. 889–893.
97. Padilla P. A. Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo / P. A. Padilla, M. B. Roth // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2001. – Vol. 98. P. 7331–7335.
98. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation / R. C. Zanardo, V. Brancalone, E. Distrutti [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20. – P. 2118–2120.
99. Shen W. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption / W. Shen, T. H. Hintze, M. S. Wolin // *Circulation.* – 1995. – Vol. 92. – P. 3505–3512.
100. Distrutti E. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels / E. Distrutti // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 316. – P. 325–335.
101. Qingyou Z. Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension / Z. Qingyou // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 317. – P. 30–37.
102. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs / S. Fiorucci, E. Antonelli, E. Distrutti [et al.] // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 129. – P. 1210–1224.
103. Bian, J. S. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes / J. S. Bian // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 316. – P. 670–678.
104. Johansen D. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury - evidence for a role of KATP channels / D. Johansen, K. Ytrehus, G. F. Baxter // *Basic Res. Cardiol.* – 2006. – Vol. 101. – P. 53–60.

105. Hydrogen sulfide donor protects against acute myocardial ischemia–reperfusion injury [Электронный ресурс] / J. W. Elrod, J. W. Calvert, M. R. Duranski, D. J. Lefer // American Heart Association web site [online]. – 2006. – Режим доступа:
106. Sodha N. Exogenous sulfide reduces myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury / N. Sodha // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2007. – Vol. 6, (Suppl. 3) – P. 275.
107. Elrod J. W. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury by preservation of mitochondrial function / J. W. Elrod // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 15560–15565.
108. Li L. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative / L. Li // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. P. 706–719.
109. Surviving blood loss using hydrogen sulfide / M. L. Morrison, J. E. Blackwood, S. L. Lockett [et al.] // *J. Trauma.* – 2008. – Vol. 65, № 1. – P. 183–188.
110. Mok Y. Y. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis / Y. Y. Mok // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 143. – P. 881–889.
111. Collin M. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia / M. Collin // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 146. – P. 498–505.
112. Li L. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide–induced inflammation in the mouse / L. Li // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1196–1198.
113. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse / H. Zhang, L. Zhi, P. K. Moore, M. Bhatia // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2006. – Vol. 290. – P. 1193–1201.
114. Different regulatory effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on gastric motility in mice / X. Huang, X. M. Meng D. H. Liu [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 720, № 1–3. – P. 276–285.

115. Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics / K. Módis, C. Coletta, K. Erdélyi [et al.] // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 601–611.
116. Pouokam E. Regulation of colonic ion transport by gasotransmitters / E. Pouokam, J. Steidle, M. Diener // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 34, № 6. – P. 789–793.
117. Linden D. R. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract / D. R. Linden // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2014. – Vol. 20, № 5. – P. 818–830.
118. Emerging role of hydrogen sulfide in colonic physiology and pathophysiology / M. Medani, D. Collins, N. G. Docherty [et al.] // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 1620–1625.
119. Wallace J. L. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract / J. L. Wallace // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2010. – Vol. 12, № 9. – P. 1125–33.
120. Evidence that endogenous hydrogen sulfide exerts an excitatory effect on gastric motility in mice / Y. F. Han, X. Huang, X. Guo [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 673, № 1-3. – P. 85–95.
121. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract / G. R. Martin, G. W. McKnight, M. S. Dickey [et al.] // *Dig. Liver Dis.* – 2010. – Vol. 42, № 2. – P. 103–109.
122. Hosoki R. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide / R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – Vol. 237, № 3. – P. 527–531.
123. H₂S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and K(ATP) channels / W. Lu, J. Li, L. Gong // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171, № 6. – P. 1534–1550.
124. Zhao W. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues / W. Zhao, J. F. Ndisang, R. Wang // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 81, № 9. – P. 848–853.

125. Hydrogen sulfide modulates contractile function in rat jejunum / M. S. Kasparek, D. R. Linden, G. Farrugia, M. G. Sarr // J. Surg. Res. – 2012. – Vol. 175, № 2. – P. 234–242.
126. The inhibitory effects of hydrogen sulfide on pacemaker activity of interstitial cells of cajal from mouse small intestine / S. P. Parajuli, S. Choi, J. Lee [et al.] // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2010. – Vol. 14, № 2. – P. 83–89.
127. Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues / D. R. Linden, L. Sha, A. Mazzone [et al.] // J. Neurochem. – 2008. – Vol. 106, № 4. – P. 1577–1585.
128. Effect of endogenous hydrogen sulfide on the transwall gradient of the mouse colon circular smooth muscle / L. Sha, D. R. Linden, G. Farrugia, J. H. Szurszewski // J. Physiol. – 2014. – Vol. 592, № 5. – P. 1077–1089.
129. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon / R. Schicho, D. Krueger, F. Zeller [et al.] // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 131, № 5. – P. 1542–1552.
130. Gil V. Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility / V. Gil, D. Gallego, M. Jimnez // Br. J. Pharmacol. – 2011. – Vol. 164, № 2. – P. 485–498.
131. Detoxification of H(2)S by differentiated colonic epithelial cells: implication of the sulfide oxidizing unit and of the cell respiratory capacity / S. Mimoun, M. Andriamihaja, C. Chaumontet [et al.] // Antioxid. Redox. Signal. – 2012. – Vol. 17, № 1. – P. 1–10.
132. Абдулганиева Д. И. Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта: взгляд клинициста [Электронный ресурс] / Д. И. Абдулганиева, Л. И. Мясоутова // Практическая медицина. – 2008. – Режим доступа: <http://pmarchive.ru/>
133. Antisecretory Effect of Hydrogen Sulfide on Gastric Acid Secretion and the Involvement of Nitric Oxide / S. A. Mard, H. Askari, N. Neisi, A. Veisi // Biomed. Res. Int. – 2014. – P. 480–521.

134. Effects of endogenous production and exogenous administration of H₂S on gastric acid secretion in rats / S. A. Mard, M. Maleki, M. K. Gharib Naseri, A. H. Saberi // *The Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2011. – Vol. 15, №. 4. – P. 499–506.
135. Stimulation of duodenal HCO₃[–] secretion by hydrogen sulphide in rats: Relation to prostaglandins, nitric oxide and sensory neurones / F. Ise, H. Takasuka, S. Hayashi [et al.] // *Acta Physiologica* – 2011. – Vol. 201, № 1. – P. 117–126.
136. Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig / P. Zhao, X. Huang, Z.-Y. Wang [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 616, № 1-3 – P. 223–228.
137. Evidence that endogenous hydrogen sulfide exerts an excitatory effect on gastric motility in mice / Y.-F. Han, X. Huang, X. Guo [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2011. – Vol. 673, № 1-3. – P. 85–95.
138. Nitric oxide – an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands / A. Berg, S. Redeen, A.-C. Ericson, S. E. Sjostrand // *BMC Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 4, article 16.
139. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor / S. Kato, M. Kitamura, R. P. Korolkiewicz, K. Takeuchi // *British Journal of Pharmacology*. – 1998. – Vol. 123, № 5. – P. 839–846.
140. Morphological support for paracrine inhibition of gastric acid secretion by nitric oxide in humans / A. Berg, S. Kechagias, S. E. Sjostrand, A.-C. Ericson // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 36, № 10. – P. 1016–1021.
141. Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes / L.-F. Hu, T.-T. Pan, K. L. Neo [et al.] // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. – 2008. – Vol. 455, № 6. – P. 971–978.

142. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats / J. L. Wallace, L. Vong, W. McKnight [et al.] // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137, № 2. – P. 569–578.
143. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *EMBO. J.* – 2010. – Vol. 20 № 21. – P. 6008–6016.
144. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension / S. Kubo, I. Doe, Y. Kurokawa [et al.] // *Toxicology*. – 2007. – Vol. 232, № 1-2. – P. 138–146.
145. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? / M.Y. Ali, C.Y. Ping, Y.Y. Mok [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 149, № 6. – P. 625–634.
146. Huang X. Synthesis of H₂S in the Gastrointestinal Tract / X. Huang, Xu. Wen-Xie // *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*. – 2015. – Vol. 4, № 2. – P. 1459–1464.
147. Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced gastric emptying of liquid in awake mice / J. V. Medeiros, V. H. Bezerra Lucetti, R. C. Lima-Junior [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 693, № 1-3. – P. 57–63.
148. Nagao M. Role of hydrogen sulfide as a gasotransmitter in modulating contractile activity of circular muscle of rat jejunum / M. Nagao, J. A. Duenes, M. G. Sarr // *J. Gastrointest. Surg.* – 2012. – Vol. 16, № 2. – P. 334–343.
149. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum / D. Gallego, P. Clav, J. Donovan [et al.] // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2008. – Vol. 20, № 12. – P. 1306–1316.
150. Slow regulated release of H₂S inhibits oxidative stress induced cell death by influencing certain key signaling molecules / A. S. Majid, A. M. Majid, Z.Q. Yin, D.Ji // *Neurochem. Res.* – 2013. – Vol. 38, № 7. – P. 1375–1393.

151. Teague B. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility / B. Teague, S. Asiedu, P. K. Moore // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 137, № 2. – P. 139–145.
152. Hydrogen sulfide-mediated regulation of contractility in the mouse ileum with electrical stimulation: Roles of l-cysteine, cystathionine-synthase, and K⁺-channels / S. Yamane, T. Kanno, H. Nakamura [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 740. – P. 112–120.
153. Mechanisms of action of the gasotransmitter hydrogen sulfide in modulating contractile activity of longitudinal muscle of rat ileum / M. Nagao, D. R. Linden, J. A. Duenes, M. G. Sarr // *J. Gastrointest. Surg.* – 2011. – Vol.15, № 1. – P. 12–22.
154. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels / E. Distrutti, L. Sediari, A. Mencarelli [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 316, № 1. – P. 325–335.
155. Effects of hydrogen sulphide on motility patterns in the rat colon / V. Gil, S. Parsons, D. Gallego [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 169, №1. – P. 34–50.
156. Actions of hydrogen sulfide and ATP-sensitive potassium channels on colonic hypermotility in a rat model of chronic stress / Y. Liu, H. Luo, C. Liang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(2). – P. 55853.
157. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide / M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 343, № 1. – P. 303–310.
158. Healing of chronic gastric ulcerations by L-arginine. Role of nitric oxide, prostaglandins, gastrin, and polyamines / T. Brzozowski, S. J. Konturek, D. Drozdowicz [et al.] // *Digestion.* – 1995. – Vol. 56. – P.463–471.
159. Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats / S.J. Konturek, A. Dembinski, Z. Warzecha [et al.] // *Gastroenterology.* – 1988. – Vol. 94. – P.1300–1307.

160. Role of endogenous basic fibroblast growth factor in the healing of gastric ulcers in rats / H. Satoh, A. Shino, F. Sato [et al.] // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 73. – P. 59–71.
161. Ma L., Wallace, J. L. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats / L. Ma, J. L. Wallace // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 341–346.
162. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats / S. N. Elliott, W. McKnight, G. Cirino, J. L. Wallace // *Gastroenterology*. – 1995. – Vol. 109. – P. 524–530.
163. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver / S. Fiorucci, E. Distrutti, G. Cirino, J. L. Wallace // *Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 131. – P. 259–271.
164. Wallace J. L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years / J. L. Wallace // *Gastroenterology*. – 1997. – Vol. 112. – P. 1000–1016.
165. Ferreira S. H. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release / S. H. Ferreira, I. D. Duarte, B. B. Lorenzetti // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 201. – P. 121–122.
166. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace, M. Dickey, W. McKnight, G. R. Martin // *FASEB Journal*. – 2007. – Vol. 21, № 14. – P. 4070–4076.
167. Peura D. A. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications / D. A. Peura // *Am. J. Med.* – 2004. – Vol. 117 (Suppl 5A). – P. 63–71.
168. Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells / G. Tang, L. Wu, W. Liang, R. Wang // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 68. – P. 1757–1764.

169. Zhao W. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms / W. Zhao, R. Wang // *The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. – 2002. – Vol. 283, № 2. – P. 474–480.
170. Salim A. S. Sulfhydryl-containing agents stimulate the healing of duodenal ulceration in man / A. S. Salim // *Pharmacology*. – 1992. – Vol. 45. – P. 170–180.
171. Stimulation of mucosal glutathione and angiogenesis: new mechanisms of gastroprotection and ulcer healing by sucralfate / Z. Sandor, M. Nagata, S. Kusstatscher, S. Szabo // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1995. – Vol. 210. – P.19–21.
172. Boyd S. C. Gastric glutathione depletion and acute ulcerogenesis by diethylmaleate given subcutaneously to rats / S. C. Boyd, H. A. Sasame, M. R. Boyd // *Life. Sci.* – 1981. – Vol. 28. – P. 2987–2992.
173. Ma L. Cigarette smoking delays ulcer healing: role of constitutive nitric oxide synthase in rat stomach / L. Ma, J. Y. Chow, C. H. Cho // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. 238–248.
174. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasburg: Council of Europe. – 1986. – № 123. – 52 p.
175. Blackstone E. H₂S induces a suspended animation-like state in mice / E. Blackstone, M. B. Roth // *Science*. – 2005. – Vol. 308. – P. 518.
176. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells / M. Goubern, M. Andriamihaja, T. Nubel [et al.] // *FASEB J.* – 2007. – Vol. 21. – P.1699–1706.
177. Kashfi K. NOSH-sulindac (AVT-18A) is a novel nitric oxide- and hydrogen sulfide-releasing hybrid that is gastrointestinal safe and has potent antiinflammatory, analgesic, antipyretic, antiplatelet, and anticancer properties / K. Kashfi, M. Chattopadhyay, R. Kodela // *Redox. Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 287–296.
178. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, Б. В. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.

179. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. чл-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : ВД «Авіцена», 2001. – 527 с.
180. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats / Y. Z. Zhu, Z. J. Wang, P. Ho [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2007. – Vol.102, 1. – P. 261–268.
181. S-propargyl-cysteine protects both adult rat hearts and neonatal cardiomyocytes from ischemia/hypoxia injury: the contribution of the hydrogen sulfide-mediated pathway / Q. Wang, H. R. Liu, Q. Mu, [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2009. – Vol. 54, № 2. – P.139–146.
182. A nociceptive-intensity-dependent role for hydrogen sulphide in the formalin model of persistent inflammatory pain / A. T. Lee, J. J. Shah, L. Li [et al.] // Neuroscience. – 2008. – Vol. 152, № 1. – P. 189–96.
183. Hydrogen sulfide regulates vascular endoplasmic reticulum stress in apolipoprotein E knockout mice / Z. F. Chen, B. Zhao, X. Y. Tang [et al.] // Chin. Med. J. (Engl). – 2011. – Vol. 124, № 21. – P. 3460–3467.
184. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels / M. W. Warenycia, L. R. Goodwin, C. G. Benishin [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 1989. – Vol. 38, № 6. – P. 973–981.
185. Nicholson C. K. Hydrogen sulfide and ischemia–reperfusion injury / C. K. Nicholson, J. W. Calvert // Pharmacol. Res. – 2010. – Vol. 62, № 4. – P. 289–297.
186. H₂S ameliorates oxidative and proteolytic stresses and protects the heart against adverse remodeling in chronic heart failure / P. K. Mishra, N. Tyagi, U. Sen [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2010. – Vol. 298, № 2. – P. 451–456.
187. Волощук Н. І. Гендерні відмінності в утворенні гідроген сульфїду та реалізації його вазорелаксуючого ефекту за умов введення диклофенаку натрію та генїстеїну у щурів / Н. І. Волощук // Журнал Академії медичних наук України. – 2010. – Т. 16, № 1. – С. 138–148.

188. Пастушенко Т. В. Експрес-метод визначення середньо смертельних доз хімічних речовин / Т. В. Пастушенко, Л. Б. Марушій, О. О. Жуков // Гігієна і санітарія. – 1985. – № 6. – С. 46–49.
189. Визначення вмісту гідроген сульфіду в сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н. О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісник наукових досліджень. – 2009. – № 1. – С. 29–32.
190. Волощук Н. І. Гостра токсичність гідроген сульфіду та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Медична хімія. – 2011. – Т. 13, № 4 (49). – С. 88–91.
191. Яковлева Л. В. Експериментальне вивчення нових противиразкових препаратів / Л. В. Яковлева, Г. В. Оболенцева, Л. П. Брюзгінова. В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. Рекомендації / ред. О. В. Стефанов. – К. : ВД «Авіцена», 2001. – С. 321–333.
192. Андреева А. И. Некоторые показатели влияния пиразидола на ЖКТ / А. И. Андреева // Фармакология и токсикология. – 1978. – № 4. – С. 428–432.
193. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура. – М. : Медицина, 1974. – 142 с.
194. Станіславчук М. А. Оптимізація фармакотерапії хворих на ревматоїдний артрит нестероїдними протизапальними та анальгетичними препаратами. Фармакокінетичні та фармакодинамічні підходи : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук : спец. 14.01.28 «Клінічна фармакологія» / М. А. Станіславчук. – Київ, 1997. – 48 с.
195. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test / J. E. Torres–Lopez, M. I. Ortiz, G. Castaneda–Hernandez [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 70, № 14. – P. 1669–1676.
196. Lee I.-O. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats / I.-O. Lee, Y.-S. Jeong // J. Korean Med. Scitnces. – 2002. – Vol. 17. – P. 81–85.

197. Мельник А. В. Активність ензимів синтезу гідрогенсульфіду в нирках щурів / А. В. Мельник, О. О. Пентюк // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 4. – С. 12–22.
198. Пат. України на корисну модель № 52136 U МПК (2009) G01N 33/68. Спосіб визначення вмісту гідроген сульфід у плазмі крові / Заїчко Н. В., Пентюк Н.О., Мельник А.В.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М.І. Пирогова. – № у 201003158; заявл. 19.03.2010; опубл. 10.08.2010; Бюл. № 15. – 2 с.
199. Ramipril Affects Hydrogen Sulfide Generation in Mouse Liver and Kidney / B. Wiliński, J. Wiliński, E. Somogyi [et al.] // Folia Biol. (Krakow). – 2011. – Vol. 59, № 3–4. – P.151–155.
200. Коренман И. М. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман // М. : Химия, 1975. – 360 с.
201. Гула Н. М. Вплив N–стеароїлетаноламіну на NO–синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом / Н. М. Гула, Г. В. Косякова, А. Г. Бердишев // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т.79, № 5. – С. 153–158.
202. Мевх А. Т. Изучение эндопероксидпростагландинсинтетезы микросомной фракции тромбоцитов человека / А. Т. Мевх, В. В. Басевич, С. Д. Варфоломеев // Биохимия. – 1982. – Т. 47, № 10. – С. 1635–1639.
203. P22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats / T. Fukui, N. Ishizaka, S. Rajagopalan [et al.] // Circ. Res. – 1997. – № 80(1). – P. 45–51.
204. Костюк В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.
205. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М. : Высшая школа, 1980. – 272 с.

206. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гавришвили // Современные методы в биохимиию - под ред. В. Н. Ореховича. - М.: Медицина, 1977. - С. 66 - 68.
207. Пат. України на винахід №58110А, МПК 7 А61К35/16. Спосіб визначення карбонільних сполук в сироватці крові / С. В. Шевчук, О. О. Пентюк, Р. А. Мусін, Н. В. Заїчко; заявник та патентовласник Український державний НДІ реабілітації інвалідів МОЗ України. – № 2002107890; заявл. 04.10.2002; опубл. 15.07.2003; Бюл. № 7. – 2 с.
208. Ludowieg J. Colorimetric differentiation of hexosamines. / J. Ludowieg, J. D. Benmamoun // Anal. Biochem. – 1967. – Vol.19, № 1. – P.80–88.
209. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – С. 126–135.
210. А. с. 1028315 СССР, МКИ А 61 В 5/10. Устройство для исследования реакций мышц / И.А. Назарук, С.А. Бернштейн, А.И.Соловьев [и др.] (СССР). – № 1028315 А 61 В 5/10; заявл. 23.11.81 ; опубл. 15.07.83, Бюл. № 26.
211. Электрофизиологический анализ возбуждающего действия серотонина на коронарные артерии / А. В. Гурковская, В. А. Бурый, Н. И. Гокина, М. Ф. Шуба // Физиологический журнал. – 1998. – Т. 34, № 5. – С. 66–72.
212. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер. – М : Медицина, 1978. – 294 с.
213. Носков В. Н. Компьютерная биометрика / В. Н. Носков. – М. : Изд-во МГУ, 1990. – 232 с.
214. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms / S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Pawlik [et al.] // J. of Physiology and pharmacology. – 2004. – Vol.55, Suppl 2. – P.5–17.
215. Веснина Л. Э. Липидные рафты: роль в регуляции функционального состояния клеточных мембран / Л. Э. Веснина // Актуальні проблеми

- сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2013. – Том 13, Випуск 2(42). – С. 5–10.
216. Schwertz D. W. Changes in phosphoinositide–specific phospholipase C and phospholipase A2 activity in ischemic and reperfused rat heart / D. W. Schwertz, J. Halverson // *Basic. Res. Cardiol.* – 1992. – Vol. 87, № 2. – P. 113–127.
 217. Hydrocarbon chain length–dependent antagonism of acylcarnitines to the depressant effect of lysophosphatidylcholine on cardiac sodium current / T. Sato, H. Ishida, H. Nakazawa, M. Arita // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1996. – Vol. 28, № 10. – P. 2183–2194.
 218. Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine / K. Kugiyama, S. Sugiyama, N. Ogata [et al.] // *Atherosclerosis.* – 1999. – Vol. 143, № 1. – P. 201– 204.
 219. Мушкамбаров Н. Н. Молекулярная биология: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : Медицинское информ агенство, 2007. – 536 с.
 220. Translocation of heme oxygenase–1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non–steroidal anti–inflammatory drug–induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury / S. Bindu , C. Pal, S. Dey [et al.] // *J Biol Chem.* –2011. – Vol. 286, № 45. – P. 39387–39402.
 221. Satoh H. Exacerbation of nonsteroidal anti–inflammatory drug–induced small intestinal lesions by antisecretory drugs in rats: the role of intestinal motility / H. Satoh, K. Amagase, K. Takeuchi // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2012. – Vol. 343, № 2. – P.270–277.
 222. Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules / H. Kimura // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* – 2015. – Vol. 91, № 4. – P 131–159.
 223. Stein A. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology / A. Stein, S. M. Bailey // *Redox Biol.* – 2013. – Vol.1, № 1. – P. 32–39.

224. Stimulation of duodenal HCO_3^- secretion by hydrogen sulphide in rats: relation to prostaglandins, nitric oxide and sensory neurones / F. Ise, H. Takasuka, S. Hayashi [et al.] // *Acta. Physiol. (Oxf)*. – 2011. – Vol. 201, № 1. – P. 117–126.
225. Викторов А. П. Контроль за безопасностью нестероидных противовоспалительных препаратов при медицинском применении / А. П. Викторов // *Український медичний вісник*. – 2009. – №3 (35). – С. 33-37.
226. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction / W. Guo, J. T. Kan, Z. Y. Cheng [et al.] *Oxid. Med. Cell Longev*. – 2012. -Published online 2012 Dec 5. doi:10.1155/2012/878052.
227. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H_2S): development of H_2S -releasing drugs as pharmaceuticals / G. Caliendo, G. Cirino, V. Santagada, J. L. Wallace // *J. Med. Chem*. – 2010. – Vol. 53, № 17. – P. 6275–6286.
228. Sodium hydrosulfide alleviated pulmonary vascular structural remodeling induced by high pulmonary blood flow in rats / X.H. Li , J.B. Du, D.F. Bu [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin*. – 2006. – Vol. 27, № 8. – P.971–980.
229. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide / M. Lee, C. Schwab, S. Yu [et al.] // *Neurobiol. Aging*. – 2009. – P.234-238
230. Voloshchuk N. I. Influence of diclofenac sodium on biochemical indicators of stomach mucosa conditions against the background of excess and deficiency of hydrogen sulfide in rats / N. I. Voloshchuk, I. V. Taran, A. V. Mel'nik // *The Science Advanced* . – 2015. – Vol. 01. – P. 36–40.
231. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia–reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling / S. Jha , J. W. Calvert, M. R. Duranski [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. – 2008. – Vol. 295, № 2. – P. 801–806.
232. Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor / H. Kimura // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2000. – Vol. 267. № 1. – P. 129–133.

233. Kimura H. Hydrogen sulfide: from brain to gut / H. Kimura // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2010. – Vol.12, № 9. – P. 1111–1123.
234. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest / S. Carballal, M. Trujillo, E. Cuevasanta [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 50, № 1. – P. 196–205.
235. Свиницкий А. С. Гастродуоденальные осложнения противовоспалительной терапии в ревматологической практике / А. С. Свиницкий, О. Г. Пузанова // *Український ревматологічний журнал.* – 2002. – № 2(8). – С. 15–23.
236. Исаков В. А. Гастропатия, связанная с приемом нестероидных противовоспалительных препаратов: патогенез, лечение и профилактика / В. А. Исаков // *Клиническая фармакология и терапия.* – 2005. – № 14. – С. 56–62.
237. Schwertz D. W. Changes in phosphoinositide-specific phospholipase C and phospholipase A2 activity in ischemic and reperfused rat heart / D. W. Schwertz, J. Halverson // *Basic. Res. Cardiol.* – 1992. – Vol. 87, № 2. – P. 113–27.
238. S-diclofenac protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice via ameliorating cardiac gap junction remodeling / H. Zhang, A. Zhang, C. Guo [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 10. – P. 26441.
239. Antioxidative effects of sulfurous mineral water: protection against lipid and protein oxidation / S. Benedetti, F. Benvenuti, G. Nappi [et al.] // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 63, № 1. – P. 106–112.
240. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? / M. Whiteman, J.S. Armstrong, S.H. Chu [et al.] // *J. Neurochem.* – 2004. – Vol. 90, № 3. – P. 765–768.
241. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide / M. Whiteman, L. Li, I. Kostetski [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 343, № 1. – P. 303–310.

242. Kimura Y. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress / Y. Kimura, H. Kimura // *FASEB J.* – 2004. – Vol.18, № 10. – P. 1165–1167.
243. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology / N. Ballatori, S. M. Krance, R. Marchan, C. L. Hammond // *Mol. Aspects. Med.* – 2009. – Vol. 30, № 1-2. – p. 13–28.
244. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling / J.W. Calvert, S. Jha, S. Gundewar [et al.] // *Circ Res.* – 2009. – Vol. 105, № 4. P. 365–374.
245. Therapeutic potential of new hydrogen sulfide-releasing hybrids / A. Sparatore, G. Santus, D. Giustarini [et al.] // *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 109–121.
246. Hydrogen sulfide mitigates matrix metalloproteinase-9 activity and neurovascular permeability in hyperhomocysteinemic mice / N. Tyagi, S. Givvimani, N. Qipshidze [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2010. – Vol. 56, № 2. – P. 301–307.
247. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20, № 21. – P. 6008–6016.
248. Hydrogen sulfide causes relaxation in mouse bronchial smooth muscle / S. Kubo, I. Doe, Y. Kurokawa, A. Kawabata // *J. Pharmacol. Sci.* – 2007. – Vol. 104, № 4. – P. 392–396.
249. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis / T. A. Chan, P. J. Morin, B. Vogelstein, K. W. Kinzler // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – Vol. 95. – P. 681–686.
250. Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by non-steroidal antiinflammatory drugs in cultured gastric cells / H. Kusuhara, H. Komatsu, H. Sumichika, K. Sugahara // *Eur. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 383. – P. 331–337.
251. Johal K. Opposite effects of flurbiprofen and the nitroxybutyl ester of flurbiprofen on apoptosis in cultured guinea-pig gastric mucous cells / K. Johal, P. J. Hanson // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 130. – P. 811–818.

252. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions / W. Tomisato, S. Tsutsumi, T. Hoshino [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 67. – P. 575–585.
253. NSAIDs induce both necrosis and apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture / W. Tomisato, S. Tsutsumi, K. Rokutan[et al.] // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* Published. – 2001. – Vol. 281, № 4. – P.1092 – 1100.
254. Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology* / S. Fiorucci, E. Antonelli, L. Santucci [et al.] // 1999. – Vol. 116. – P. 1089–1106.
255. Nonsteroidal antiinflammatory drugs could reverse *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and proliferation in gastric epithelial cells / G. H. Zhu, X. L. Yang, K. C. Lai [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 1998. – Vol. 43. – P.1957–1963.
256. Song Z. Death by design: mechanism and control of apoptosis / Z. Song, H. Steller // *Trends Biochem. Sci.* – 2000. – Vol. 24. – P. 49–52.
257. Ashton M.J. Disparate effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on apoptosis in guinea-pig gastric mucous cells: inhibition of basal apoptosis by diclofenac / M. Ashton, P. J. Hanson // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 135, № 2. – P. 407–416.
258. H₂S donor, S-propargyl-cysteine, increases CSE in SGC-7901 and cancer-induced mice: evidence for a novel anti-cancer effect of endogenous H₂S? / K. Ma, Y. Liu, Q. Zhu [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 6. – P. 20525.
259. Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF-κB dependent anti-inflammation pathway / C. Guo , F. Liang , W. Shah Masood , X. Yan // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol.15. – P. 70–78.

260. A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium / D. Yonezawa, F. Sekiguchi, M. Miyamoto [et al.] // Toxicology. – 2007. – Vol. 20, № 1-2. – P. 11-18.