

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»**

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

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
ВОЛОЩУК Наталія Іванівна,
Вінницький національний медичний університет
імені М.І. Пирогова МОЗ України,
завідувач кафедри фармакології.

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України **Лук'янчук Віктор Дмитрович,** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», завідувач відділу фармакокінетики;

- доктор медичних наук, професор, заслужений лікар України **Анохіна Галина Анатоліївна,** Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, професор кафедри гастроентерології, дієтології і ендоскопії.

Захист відбудеться 6 квітня 2016 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за адресою: 03680, м. Київ, вул. Е. Пот'є, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за адресою: 03680, м. Київ, вул. Е. Пот'є, 14.

Автореферат розісланий «___» _____ 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,
кандидат біологічних наук

І.В. Данова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 [Каратеев А.Е. 2009; Вікторов О.П., Кашуба О.В., 2010; Ткач С.М., 2015; Palileo C., Kaunitz J.D., 2011; Blackler R., 2012]. 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 [Бенца Т.М., 2007; Степанов Ю.М., Бреславец Ю.С. 2013; L. Laine et al., 2007; Laporte J. et al., 2010].

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 E₂, блокаторів H₂-гістаміно рецепторів, тощо. Однак жодний з цих засобів не вирішує проблеми безпеки лікування НПЗЗ [Свинцицкий А.С., 2002; Каратеев А.Е., 2014; Анохіна Г. А., 2015; Moore R.A. et al., 2006]. Тому завдання профілактики та лікування НПЗЗ-гастропатій на сьогоднішній день не можна вважати остаточно вирішеним [Журавлева Л.В., 2013; Ткач С.М. 2013; Higuchi K. et al., 2009; Wallace J.L. et al., 2013; Schjerning Olsen A.-M. et al., 2015]. 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 [Tarnawski A.S., et al., 2012; Kemmerly T. et al., 2014]. 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 (H₂S), котрий, як і NO та CO володіє виразною судинорозширюючою дією [Wallace J.L, 2000; Coruzzi G. et al., 2007; De Backer O., Lefebvre R.A., 2007]. Вазорелаксуючий ефект H₂S опосередковується через активацію АТФ-чутливих калієвих каналів в клітинах гладенької мускулатури судин, нейронах, кардіоміоцитах і β-клітинах підшлункової залози [Li L. et al., 2011; Łowicka E., Beltowski B., 2007; Stuhlmeier K.M. et al., 2009]. Окрім регуляції судинного тонусу, H₂S бере участь в забезпеченні скоротливості міокарда, нейротрансмісії та ін. Описана суттєва роль H₂S в регуляції моторики ШКТ, секреції інсуліну, продукції жовчі [Szabó C. et al., 2007; Tan B.H., et al., 2010; Guo C. et al., 2014]. Зміни вмісту H₂S 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. [Волощук Н.І., 2009, 2010, Bhatia M. et al., 2005, Li L. et al., 2006, Fiorucci S. et al., 2011, Zaichko N.V. et al., 2014]. 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 фармакодинамічного 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 сульфідів 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 сульфідів - $NaHS$ 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 сульфідів $NaHS$ 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-Н-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 сульфід), 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 сульфід (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 $1/20 LD_{50}$ на токсикометричні параметри диклофенаку натрію у щурів.

Уточнено та доповнено дані про роль різного вмісту H_2S 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 H_2S (вірогідно зменшення $EC_{50} H_2S$ на 27,2%, порівняно з контролем). Дефіцит H_2S 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 H_2S 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 H_2S в організмі. Показано, що рівень H_2S 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 ($r=0,58$, $p<0,05$), PGN-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 $1/20$ ЛД₅₀ 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 сфері охорони здоров'я, 9 тез доповідей вітчизняних та зарубіжних конференцій, конгресів та з'їздів.

Обсяг та структура дисертації. Матеріали дисертації викладено на 168 сторінках комп'ютерного друку, з яких 130 сторінок основного тексту. Складається із вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали, моделі та методи дослідження», 3 розділів результатів власних досліджень, розділу, присвяченого аналізу та узагальненню результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, який включає 260 найменування, з них 68 – кирилицею та 192 – латиницею. Дисертація ілюстрована 32 таблицями та 19 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Досліди проведені на 341 білому щурі чоловічої статі, масою 180-250 г та 127 білих мишах, масою 20-25 г, які утримувались в умовах віварію ВНМУ імені М.І. Пирогова. Всі досліди виконані згідно правил етичного поводження з тваринами, затверджених у «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes» (Страсбург, 1986), а також вимог комісії з біоетики ВНМУ (протокол № 7 від 8.06.2015). Тварини утримувались на стандартному раціоні з доступом до води *ad libitum*, при температурі 22°C±5°C з 12-годинним освітленням.

Всі фармакологічні дослідження виконані на базі сертифікованої МОЗ України лабораторії кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво про

переатестацію №023/13 від 05.03.2013 р.), біохімічні та фізіологічні 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 №049/15 від 02.03.2015 р.). Дослідження змін клітинного циклу та фрагментації ДНК виконані на базі науково-дослідного центру ВНМУ імені М.І. Пирогова (свідоцтво про перереєстрацію №050/15 від 02.03.2015 р.).

В роботі використані: диклофенак-натрію (“Вольтарен”), Novartis; донор H_2S (NaHS) (Sigma, USA), специфічний інгібітор ключового ферменту його синтезу (ЦГЛ) – пропаргілгліцин (ППГ) (Sigma, USA).

Диклофенак вводили у терапевтичній дозі (8 мг/кг) [Тринус Ф.П., Мохорт Н.А., 1975; Методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України, 2001]. Препарат вводили в/шл один раз на день в 1% крохмальному гелі. NaHS вводили в умовно-терапевтичних дозах, які були визначені нами попередньо, а саме: 3 мг/кг в/оч для мишей, 1,5 мг/кг в/оч для щурів та 4 мг/кг в/шл для щурів. Ці дози відповідають діапазону умовно-терапевтичних доз і становлять приблизно $1/20 LD_{50}$. ППГ вводили в дозі 50 мг/кг в/оч протягом 5 днів [Wang Q. et al., 2009; Chen Z.F. et al., 2011]. Щурам контрольних груп вводили еквівалентні кількості розчинників за схемами і у тих самих дозах, що і тваринам дослідних груп.

Дослідження гострої токсичності проводили шляхом визначення LD_{50} NaHS, диклофенаку, та їх комбінації при в/оч введенні за експрес-методом Т.В. Пастушенка [1985]. Диклофенак натрію та NaHS, вводили одноразово в/оч (або в/шл); спостереження проводили протягом 14 днів.

Дослідження гастротоксичної дії проводили після в/шл введення НПЗЗ 1 раз в день 7 днів. Стан СОШ оцінювали візуально, в балах, за стандартною шкалою: визначали наявність виразок, їх кількість на 1 тварину, важкість ураження та виразковий індекс, який розраховували за формулою [Яковлева Л.В. и співав., 2001]. Вплив на секрецію шлункового соку проводили за методом А.І. Андрєєвої [1978]. Вивчення евакуаторної функції шлунка та моторної функції кишечника визнали за допомогою методу «міток» [Методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України, 2001].

Біохімічні дослідження. Продукцію H_2S оцінювали за приростом сульфід-аніону, вміст якого визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [Мельник А.В., Пентюк О.О., 2009]. 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) [Заїчко Н.В., 2010]. Вміст H_2S в СОШ визначали за методикою [Wiliński V. et al., 2011]. Активність ЦГЛ оцінювали за приростом сульфід-аніону в реакції з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [Заїчко Н.В. та співавт., 2010]. В постядерному супернатанті СОШ визначали рівень ГАГ за реакцією з ацетилацетоном та парадиметилбензальдегідом [Ludowig J., Venman J.D., 1967]. Фракції фосфоліпідів

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.

визначали методом тонко-шарової хроматографії на силікагелі Л5/40 (Chemapol, Чехія) [Кейтс М., 1975]. Вміст МДА оцінювали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Стальная И.Д., Гавришвили Т.Г., 1977], КГП - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [Шевчук С.В. та співавт., 2003]. Активність НАДФН-оксидази визначали за поглинанням НАДФН при 340 нм [Fukui T. et al., 1997.], СОД - за здатністю гальмувати окиснення кверцетину [Костюк В.А. и соавт., 1990]. Активність РGH-синтази визначали спектрофотометрично за накопиченням окисненої форми адреналіну [Мевх А.Т. и др., 1982]. Вміст нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Гріса [Коренман И.М., 1975]. Сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS) встановлювали за кількістю утвореного нітрит-аніону (NO_2^-) [Гула Н.М. и соавт., 2007]. Вміст протеїну визначали мікробіуретовим методом [Кочетов Г.А., 1980.]

Аналіз клітинного циклу виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" (Partec, Німеччина) Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 20 тис. подій. Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина). Оцінювали наступні показники клітинного циклу: G_0G_1 (відсоток ядер клітин з вмістом ДНК=2с); S – фаза синтезу (відсоток ядер клітин з вмістом ДНК >2с<4с); G_2+M - клітини в яких відбувається підготовка до поділу (ДНК=4с). Фрагментацію ДНК (показник апоптозу) визначали шляхом виділення інтервалу SUB- G_0G_1 (відсоток ядер клітин з вмістом ДНК<2с); IP – проліферативний індекс (S+(G2+M), а також BP – блок проліферації (S/(G2+M).

Методика реєстрації скоротливості гладком'язових препаратів судин. В досліджах *in vitro* тензометрично реєстрували зміни тонуру ізолюваних кільцеподібних фрагментів мезентеріальних судин щурів в режимі, що наближався до ізометричного за допомогою ємнісних датчиків напруження за методикою [Назарук И.А. и соавт., 1983]. Реєстрацію скоротчувальної активності проводили за допомогою аналогово-цифрового перетворювача National Instruments USB-6008/6009, з'єданого з персональним комп'ютером.

Дослідження специфічної фармакологічної активності. Знеболюючу дію визначали на моделі електричного подразнення за допомогою апарату ЭСЛ-1 [Гацура В.В., 1974; Методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України, 2001] та формалінового тесту [Станіславчук М.А., 1996]. За поріг больової чутливості (ПБЧ) приймали таку напругу електричного струму, яка викликала больові відчуття у тварин (вокалізацію та/або імерсію хвоста). Дослідження протизапальної дії виконували на моделі карагенінового та формалінового набряку мишей та щурів [Методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України, 2001].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційного та перцентильного аналізу з використанням пакету прикладних програм «STATISTICA 6.1» (належить НДЦ ВНМУ імені М. І. Пирогова, ліцензійний № ВХХR901E246022FA) із застосуванням непараметричних методів оцінки отриманих результатів [Гублер Е.В., 1978, Носков В.Н., 1990]. Достовірність різниці між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерія Мана-Уїтні, кутового перетворювача Фішера, критерію Крускала-Уоллеса-

Вілкоксона та медіанного тесту. Кореляційний аналіз проводився з вирахуванням коефіцієнта кореляції (r) Пірсона. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що в умовно-терапевтичній дозі 1,5 мг/кг NaHS не погіршував параметри гострої токсичності диклофенаку за умов в/оч введення щурам, що дозволило обґрунтувати дози NaHS, для подальших досліджень.

У інтактних тварин середній вміст H_2S в сироватці крові становив $79,75 \pm 2,37$ мкмоль/л. 5-ти денне в/оч введення NaHS в умовно терапевтичній дозі, призводило до статистично вірогідного (на 13,8%) зростання рівня цього газотрансміттера в сироватці крові, а введення ППГ – навпаки, вірогідно (на 23,9%) зменшувало його вміст. Тобто, введення NaHS та ППГ створювало, відповідно, надлишок та дефіцит H_2S в крові. В/шл введення диклофенаку натрію викликало вірогідне (на 18,4%) зменшення вмісту H_2S в сироватці крові. На тлі попереднього введення ППГ депривація рівня H_2S була більш виразною (на 38,9 та 25,2% порівняно з контролем та диклофенаком, відповідно, $p < 0,05$). NaHS – навпаки, нівелював зазначені зміни рівня H_2S , і повертав його вміст в сироватці крові до рівня інтактних тварин.

Дослідження виразності ушкоджуючої дії диклофенаку натрію на шлунок за умов введення NaHS та ППГ показали, що у щурів з низьким рівнем H_2S в сироватці крові ульцерогенний вплив диклофенаку проявлявся значно сильніше, ніж у контрольних тварин: показники множинності, важкості виразкоутворення були, відповідно, на 70,8 та 30,8% більшими, а виразковий індекс в 1,6 рази перевищував аналогічні показники тварин, які отримували лише диклофенак. В групі, де диклофенак натрію вводили на тлі підвищеного рівня H_2S – навпаки, показники враження СОШ були вірогідно меншими: множинність і важкість ураження були, відповідно, на 53,5, 23,1% нижчими, а виразковий індекс – в 1,8 рази меншим, порівняно з монотерапією НПЗЗ без додаткової корекції. Тобто, рівень H_2S суттєво впливає на виразність ульцерогенної дії диклофенаку натрію за макроскопічними змінами СОШ. При цьому створення надлишку H_2S - зменшувало, тоді як зниження H_2S і організмі – навпаки, збільшувало виразність гастротоксичної дії досліджуваного НПЗЗ.

Отримані результати спонукали до перевірки можливої гастропротективної дії H_2S за інших умов: за в/шл його введення разом з диклофенаком натрію. Виявилось, що NaHS за в/шл введення статистично вірогідно зменшував прояви ушкоджуючого впливу диклофенаку натрію на СОШ. Так, множинність і важкість виразкування зменшувались на 47,5 та 28,5%, відповідно, а виразковий індекс був в 1,5 рази меншим порівняно з монотерапією НПЗЗ.

На наступному етапі визначали, як будуть змінюватись показники секреторної та рухової активності травного каналу під впливом диклофенаку натрію, NaHS та їх комбінацій. Результати засвідчили, що 5-ти денне введення NaHS викликало тенденцію до зниження загальної кислотності шлунку (на 11,1%), що узгоджується з даними літератури [Ise F. et al., 2011; Mard S. A. et al., 2014]. Диклофенак натрію - навпаки, незначно підвищував загальну кислотність шлункового соку, вочевидь, внаслідок свого «кислотного» походження ($pH=4,0$) та парасимпатикоміметичної дії

на ШКТ [Викторов А.П., 2009]. Комбіноване застосування диклофенаку натрію та NaHS достовірно не впливали на кислотність шлункового секрету.

Дослідження змін моторно-евакуаторної функції травного каналу показало, що диклофенаку натрію притаманна здатність 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 [Абдулгалиєва Д.И., Мясоутова Л.И., 2008; Викторов А.П., 2009]. На противагу цьому, NaHS, який окремо вводили щурам, на 25,7% знижував показник моторики кишечника у тварин, що також узгоджується з даними літератури [Gil V. et al., 2013] і опосередковується через пряму дозозалежну міорелаксуючу дію H_2S на рухову активність кишечника. 5-ти денне комбіноване введення щурам NaHS та диклофенаку натрію практично нівелювало зміни моторної функції кишечника тварин, які виникали під впливом монотерапії досліджуваними сполуками: довжина кишечника, пройдена контрастною речовиною в цій групі тварин статистично не відрізнялась від групи контролю.

Для з'ясування деяких механізмів, що лежать в основі впливу H_2S на захисний потенціал СОШ в умовах НПЗЗ-гастропатії, був оцінений ступінь порушень біохімічних показників СОШ, індукованих досліджуваним НПЗЗ на тлі введення NaHS та ППГ. Так, диклофенак натрію викликав вірогідне зниження вмісту ГАГ на 22,5 %, порівняно з контрольною групою. За умов введення його разом з ППГ це падіння було більш виразним і становило 35,4 %, відносно контролю, що на 16,6 % більше, порівняно з показником в групі щурів, які отримували лише диклофенак. Застосування цього НПЗЗ сумісно з NaHS не викликало достовірних змін продукції слизу відносно показника контрольної групи.

Введення НПЗЗ, що вивчається, супроводжувалось зменшенням в СОШ вмісту загальних фосфоліпідів (на 19,2 %), фосфатидилхоліну (на 25,3 %), зростанням рівня фосфатидилетаноламіну (на 21,9 %) та лізофосфатидилхоліну (на 24,2 %). За умов застосування диклофенаку натрію та ППГ відмічались більш масштабні зміни у фосфоліпідному спектрі: зниження вмісту загальних фосфоліпідів, фосфатидилхоліну становило 30,4 та 39,0 %, а зростання рівнів фосфатидилетаноламіну та лізофосфатидилхоліну - 45,1 та 48,5 %, відповідно. Введення НПЗЗ сумісно з донором H_2S практично не впливало на стан фосфоліпідів в мембранах клітин СОШ. Крім того, диклофенак натрію суттєво активував процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та білків, про що свідчить достовірне зростання вмісту МДА (на 23,3%) та КГП (на 20,7%) (табл. 1). При введенні його на тлі дефіциту H_2S рівень МДА та КГП в СОШ достовірно (на 42,4 та 40,1%, відповідно) перевищували показники в контрольній групі. Натомість введення диклофенаку натрію з екзогенним донором H_2S нормалізувало процеси перекисного окиснення ліпідів та білків. Використання НПЗЗ, що вивчається, супроводжувалось формуванням дисбалансу в системі про/антиоксидантів, а саме зростанням активності НАДФН-оксидази (на 20,6%) та зниженням активності СОД (на 17,6%) в СОШ, порівняно з контролем.

Дефіцит H_2S в організмі значно збільшував масштабність пертурбацій в системі про-антиоксидантних ензимів і викликав 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 відрізнялась від показників в контрольній групі тварин.

Таблиця 1

Вплив диклофенаку натрію на біохімічні показники СОШ щурів за умов введення NaHS та ППГ ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	Контроль	Диклофенак (Д)	Д+NaHS	Д+ППГ
ГАГ, мг/г тканини	4,13±0,12	3,20±0,14*	4,05±0,11 [#]	2,67±0,09* [#]
МДА, нмоль/мг протеїна	6,62±0,27	8,16±0,29*	6,82±0,31 [#]	9,43±0,33* [#]
КГП, нмоль/мг протеїна	2,32±0,09	2,80±0,10*	2,42±0,12 [#]	3,25±0,13* [#]
НАДФН-оксидаза, нмоль/хв. 1 мг протеїна	1,07±0,06	1,29±0,08*	1,09±0,05 [#]	1,56±0,07* [#]
СОД, ум.од./мг протеїна	1,82±0,06	1,50±0,04*	1,75±0,06 [#]	1,24±0,07* [#]

Примітки:

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

Введення диклофенаку натрію приводило до зменшення в СОШ активності ферментів, що продукують вазодилатуючі молекули: РGH-синтази, ЦГЛ, NO-синтази (на 17-24%), та вмісту їх метаболітів - H_2S , нітритів та нітратів (на 20-22%), а також зменшення чутливості мезентеріальної артерії до вазорелаксуючої дії H_2S , що підтверджувалось зміщенням кривої «доза-ефект» праворуч та вірогідним зменшення середньої ефективної концентрації H_2S (EC_{50}) на 27,5%, порівняно з контролем (табл. 2, рис. 1). Введення цього НПЗЗ на тлі дефіциту H_2S супроводжувалось посиленням негативної вазотропної дії диклофенаку, а сумісне застосування диклофенаку з NaHS практично відновлювало чутливість мезентеріальних судин до вазорелаксуючого впливу H_2S .

Таблиця 2

Вплив диклофенаку натрію на продукцію вазоактивних молекул в СОШ у щурів за умов введення NaHS та ППГ ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	Контроль	Диклофенак (Д)	Д+NaHS	Д+ППГ
1	2	3	4	5
РGH-синтаза, нмоль/хв на 1 мг протеїна	3,82±0,20	3,20 ± 0,17*	3,76±0,16 [#]	2,55±0,15* [#]
$NO_2^- + NO_3^-$, нмоль/г тканини	1,07±0,04	0,85±0,03*	1,01±0,05 [#]	0,70±0,02* [#]

1	2	3	4	5
NO-синтаза, пмоль/хв на 1 мг протеїна	1,55±0,11	1,18±0,09*	1,50±0,08 [#]	0,92±0,05* [#]
H ₂ S, нмоль/мг протеїна	1,52±0,04	1,19±0,06*	1,46±0,07 [#]	1,01±0,03* [#]
ЦГЛ, нмоль/хв на 1 мг протеїна	0,144±0,012	0,110±0,009*	0,133±0,004 [#]	0,085±0,003* [#]

Примітки:

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

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

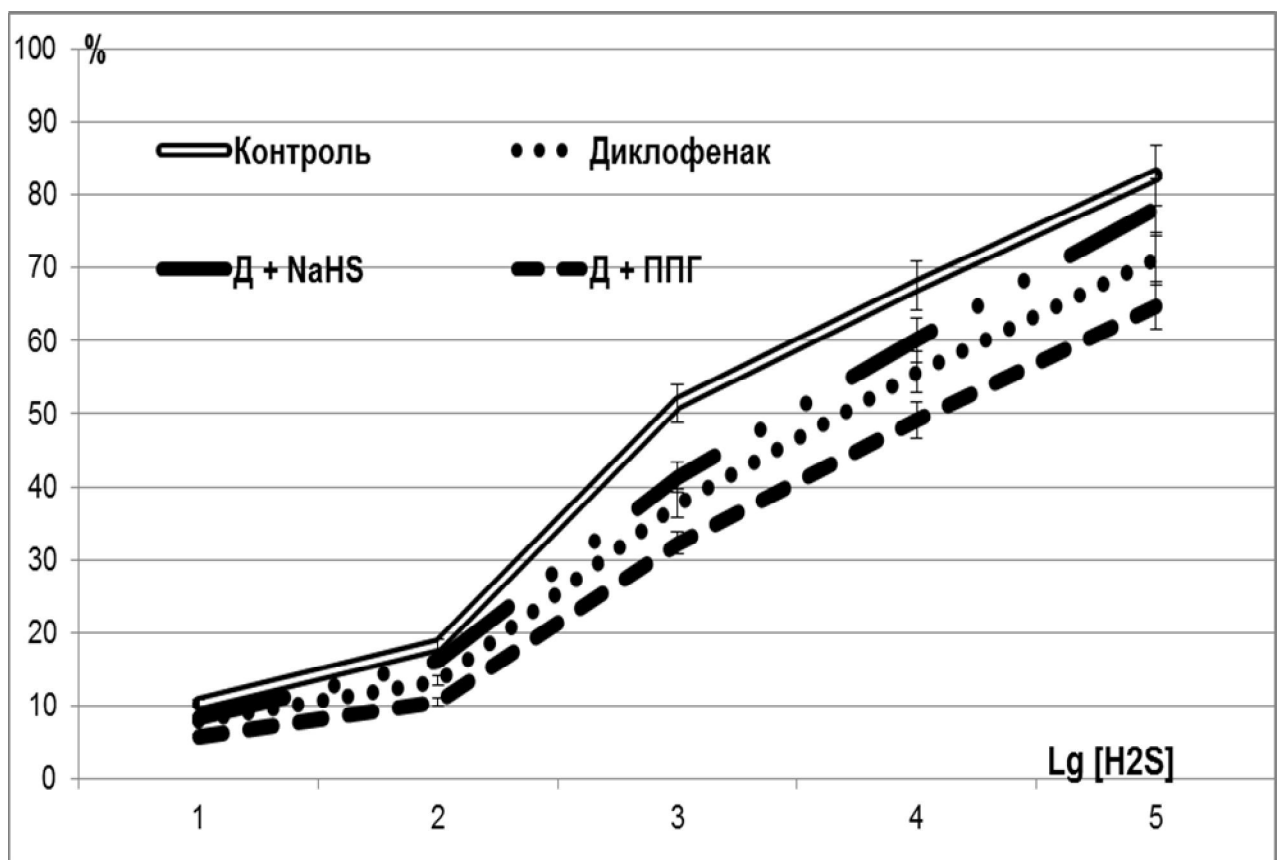


Рис. 1. Вплив різної насиченості організму щурів H₂S на індуковані диклофенаком натрію зміни H₂S-стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів мезентеріальної артерії щурів.

Проведені перцентильний та кореляційний аналізи довели причетність H₂S до реалізації гастротоксичної дії диклофенаку натрію: чим вищою була насиченість організму щурів H₂S, тим меншим був пошкоджуючий вплив диклофенаку на шлунок, і, навпаки, з низькою концентрацією H₂S корелювало зростання гастротоксичності даного НПЗЗ (табл. 3). Множинність та важкість виразкоутворення, яке викликав диклофенак, обернено корелювали з рівнем H₂S її становили, відповідно, -0,64 та -0,58 ($p < 0,05$).

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

Показники СОШ	Вміст H_2S в сироватці крові, мкмоль/л			Кореляції з рівнем H_2S в сироватці крові
	0-25 перцентиль n=8	25-75 перцентиль n=14	75-100 перцентиль n=8	
	43,3±1,70	57,3±1,18*	72,0±2,36*#	
Кількість 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*
ЛФХ, мкг/мг протеїна	24,6±1,57	21,6±1,08	17,0±1,24*#	-0,43*
ГАГ, мг/г тканини	2,61±0,09	3,27±0,14*	4,08±0,13*#	0,53*
$NO_2^- + NO_3^-$, 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*
H_2S , 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:

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

Отримані результати показали наявність зв'язку між функцією ШКТ та рівнем H_2S і підтвердили гастропротекторний ефект H_2S за умов впливу диклофенаку натрію. Високий рівень H_2S в сироватці крові у тварин відповідав мінімальній пошкодуючій дії препарату на ШКТ, а низький рівень цього газотрансміттера - з посиленням гастротоксичності диклофенаку натрію. Так, вміст H_2S виявив обернені кореляційні зв'язки з активністю ензимів-продуцентів активних форм кисню та продуктів пероксидації ліпідів і протеїнів, та прямі - з показниками антиоксидантного захисту. Захисна дія H_2S в умовах диклофенак-індукованої

гастропатії очевидно, є наслідком його позитивного впливу на продукцію шлункового слизу: вміст H_2S прямо корелював з вмістом ГАГ ($r=0,53$, $p<0,05$) та мембраностабілізуючою дією, яку підтверджує пряма кореляція з вмістом фосфатидилхоліну ($r=0,47$, $p<0,05$) і обернена з вмістом лізофосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну ($r=-0,43$ та $-0,45$, відповідно). Встановлені прямі кореляційні зв'язки між H_2S та продукцією вазодилатуючих молекул 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 ($r=0,76$, $p<0,05$).

Ще одним механізмом, який лежить в основі гастротоксичної дії диклофенаку є стимуляція процесів апоптозу на тлі розбалансування процесів регенерації слизової оболонки. На користь цього свідчить 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 (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. Про затримку проліферації свідчить виявлене достовірно менше (у 2,3 рази), середнє значення показника блоку проліферації клітин СОШ щурів, яким вводили диклофенак. Самостійне введення NaHS практично не впливало на показники клітинного циклу СОШ. Це може бути пов'язано з тим, що NaHS вводили щурам без модельованої патології, причому доза його була досить низькою (5% ЛД₅₀), а підвищення рівня його в організмі не перевершувало порогу токсичності. Водночас, при введенні диклофенаку натрію разом з NaHS, негативний вплив досліджуваного НПЗЗ на показники клітинного циклу СОШ був вірогідно меншим, а саме: кількість клітинних подій в фазі G0G1 була в 1,68 рази меншою, тоді як відсоток клітин, що перебували в фазі синтезу ДНК та у фазі G2+M були відповідно в 1,7 та 2,9 рази більшими, порівняно з монотерапією диклофенаком, що супроводжувалось збільшенням в 2,5 рази показника блоку проліферації у тварин цієї групи. Ці параметри наближались до таких у тварин контролю. Тобто, підвищення вмісту H_2S виявило виразний коригуючий вплив на негативні зміни клітинного циклу та показники ДНК-грами щурів під впливом диклофенаку натрію.

Таким чином, проведені нами дослідження засвідчили, що вміст H_2S в організмі суттєво змінює захисний потенціал СОШ, що проявляється на всіх рівнях його захисту - передепітеліальному, епітеліальному та постепітеліальному. Було виявлено, що збільшення вмісту H_2S чинить захисну дію на шлунок та збільшує здатність «протидіяти» шкідливому впливу НПЗЗ.

Постає питання щодо впливу різного рівня насиченості організму H_2S на основні фармакологічні ефекти НПЗЗ, оскільки дані літератури з цього питання є досить суперечливими [Li et al., 2006; Zanardo et al., 2006; Lee et al., 2009]. Тому надалі було оцінено наявність протизапального та знеболюючого ефектів у NaHS та ППГ, а також їх вплив на базові фармакодинамічні ефекти диклофенаку натрію.

Встановлено, що ППГ практично не впливав на прояви ноцицептивної реакції та запального процесу, а також не виявив значущого впливу на фармакологічні ефекти диклофенаку натрію. Донор H_2S при 5-ти денному введенні в умовнотерапевтичній дозі викликав слабку аналгетичну дію у тварин без запального процесу і статистично значимий антиноцицептивний ефект в умовах асептичного

запалення (формалінового тесту). Введення NaHS сприяло більш виразному антиноцицептивному ефекту диклофенаку в обидві фази вказаного тесту, однак статистичної значущості ці відмінності сягали лише в II (запальній фазі). Зареєстровано достовірне збільшення (на 95,0%) тривалості латентного періоду II фази та зменшення (на 63,4%) 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 ($p < 0,05$). NaHS вірогідно збільшував антиноцицептивну дію диклофенаку натрію також і на моделі електричного подразнення у щурів.

Крім того, попереднє введення NaHS істотно посилювало протизапальний ефект диклофенаку натрію в умовах простагландин-індукованого запального процесу (карагенінового набряку). Антиексудативна активність цієї комбінації склала 81,9%, тоді як монотерапія диклофенаком зменшувала ступінь набряку лише на 54,9%. Аналогічні результати спостерігались на моделі формалінового набряку у щурів. Антинабрякова активність при сумісному застосуванні диклофенаку натрію і NaHS була в 1,7 разів більшою, ніж при монотерапії цим НПЗЗ.

Таким чином введення донору H_2S попереджує розвиток диклофенак-індукованої гастропатії та водночас посилює протизапальний та знеболюючий ефекти 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 вазодилітаторів. 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÷93,3) мг/кг, а при введенні разом з NaHS цей параметр дорівнював 96,3 (89,0÷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 прота 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 депримууючий вплив досліджуваного НПЗЗ на продукцію вазоактивних молекул (зменшення активності РGH-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 РGH-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. Прекондиціонування 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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. *(Дисертантом проведено пошук літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, обробка отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку.)*

2. Таран І. В. Вираженість гастротоксичної дії диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфїду в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – № 4-5 (40). – С. 17–24. *(Дисертантом проаналізовано причини та патогенез розвитку НПЗЗ гастропатій, виконані експериментальні дослідження, зроблено аналіз та узагальнення отриманих даних, оформлена стаття до друку.)*

3. 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. *(Здобувачем особисто проведений огляд літературних джерел, прийнято участь у експериментальних дослідженнях, узагальненні отриманих результатів, оформлена стаття до друку.)*

4. 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. *(Дисертантом проведені експериментальні дослідження, проаналізовані отримані результати, зроблені висновки, написані фрагменти статті.)*

5. Таран І. В. Влияние сульфида 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. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку, написання окремих фрагментів.)*

6. Пат. № UA 100342 Україна, МПК А61К 33/04 (2006.01). Застосування натрієвої солі гідроген сульфїду як засобу для зменшення гастротоксичності нестероїдних протизапальних засобів. / Волощук Н. І. Таран І.В.; заявник та патентовласник Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова. – № u2015 00096; заявл.06.01.2015; опубл. 27.07.2015, Бюл. №14. – 4 с.

7. Пат. № UA 100326 U Україна, МПК (201501) А61М 21/00. Застосування натрієвої солі гідроген сульфїду для потенціювання аналгетичного 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.

8. Пат. № UA 100327 U Україна, МПК (201501) А61К 33/00 , А61М 21/00. Застосування натрієвої солі гідроген сульфїду для потенціювання антифлогогенної 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.

9. 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 конференції).

10. Вікові зміни продукції гідроген сульфїду 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).

11. 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 конгресу. – Вінниця, 2011. – С. 36-37.

12. Таран І. В. Вплив гідроген сульфїду на анальгезуючий та протизапальний ефекти диклофенаку натрію в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Лікування та реабілітація больових синдромів : 36. наук. пр. Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю. – Трускавець, 13-14 квітня 2012 р. – С. 41-44.

13. Таран І. В. Зміни біохімічних показників гастротоксичності диклофенаку натрію за умов дефіциту та надлишку гідроген сульфїду / 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.

14. Таран І. В. Зміни фармакологічного профілю диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфїду / 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 конференції. – Вінниця, 2013. – С. 213–214.

15. Вплив гідроген сульфїду 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 конгресу).

16. Таран І. В. Роль гідроген сульфїду в реалізації захисного потенціалу

слизової оболонки шлунку / І. В. Таран // Міжнародна наук.-практ. конференція молодих вчених 15 травня 2015 р. : матеріали конференції – Вінниця. - 2015. – С. 83.

17. Таран І. В. Вплив донору гідроген сульфїду 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.

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

АНОТАЦІЯ

Таран І.В. Модуляція гастротоксичності диклофенаку натрію за умов різного рівня насиченості організму гідроген сульфїдом (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2016.

В дисертації експериментально обґрунтовано нові підходи до зменшення гастротоксичності диклофенаку натрію на основі вивчення змін захисних властивостей СОШ та фармакологічних ефектів цього препарату за умов різної насиченості організму H_2S .

Доведено, що збільшення вмісту H_2S в організмі чинить протективну дію та підвищує захисний потенціал СОШ. Встановлено, дефіцит H_2S – збільшує, тоді як надлишок його - навпаки, зменшує ступінь гастротоксичності диклофенаку натрію. Застосування донору H_2S в умовно-терапевтичній дозі ($1/20$ ЛД₅₀) зменшує негативний вплив диклофенаку на захисні властивості шлунку, стан клітинних мембран та скоротливість мезентеріальних артерій, тоді як введення інгібітору синтезу H_2S потенціювало гастротоксичний ефект вказаного НПЗЗ. Показано, що $NaHS$ проявляє антиапоптотичну дію та виявляє виражений коригуючий вплив на зміни показників клітинного циклу СОШ, викликані диклофенаком натрію.

Встановлено, що донор H_2S володіє помірною антиноціцептивною та виразною протизапальною діями та посилює протизапальний та знеболюючий ефекти диклофенаку натрію.

Ключові слова: гастротоксичність, диклофенак натрію, гідроген сульфїд, пропаргїлгліцин, біохімічні зміни, слизова оболонка шлунка, апоптоз.

АННОТАЦИЯ

Таран І.В. Модуляция гастротоксичности диклофенака натрия в в условиях разного уровня насыщенности организма гидроген сульфидом (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.05 – фармакология. ГУ «Институт фармакологии и

токсикологии НАМН Украины», Киев, 2016.

Диссертационная работа посвящена проблеме улучшения фармакотерапии НПВС путем экспериментального обоснования новых подходов к уменьшению гастротоксичности диклофенака натрия на основе изучения изменений защитных свойств слизистой оболочки желудка и фармакологических эффектов этого препарата в условиях разного уровня H_2S в организме.

Введение крысам натрия H_2S в условнотерапевтической дозе ($1/20 LD_{50}$) на протяжении 5-ти дней увеличивало продукцию ГАГ (на 16,6%, $p < 0,05$), выявляло цитопротекторное действие и сопровождалось снижением показателей оксидативного стресса (содержание МДА, КГП и активность НАФН-оксидазы снижались на 19,4, 17,1 и 14,3%, соответственно ($p < 0,05$)) с одновременным повышением антиоксидантной защиты (активность СОД повышалась на 15,6% ($p < 0,05$)). Введение ППГ – наоборот, вызывало инверсию изучаемых показателей и ухудшало защитный потенциал слизистой оболочки желудка. Установлено, что дефицит H_2S повышал, а дополнительное введение $NaHS$ как при внутрибрюшинном, так и при внутрижелудочном введении снижало ульцерогенное действие диклофенака натрия, не оказывая существенных изменений секреторной и моторно-эвакуаторной функции ЖКТ.

Введение диклофенака натрия на фоне дефицита H_2S усиливало негативное действие исследуемого НПВС на биохимические параметры СОШ: в этих условиях снижение продукции ГАГ было на 16,6 % большим, чем у животных, которые получали один диклофенак; снижение содержания общих фосфолипидов, фосфатидилхолина составили 30,4 и 39,0 % ($p < 0,05$), а увеличение фосфатидилэтаноламина и лизофосфатидилхолина - 45,1 та 48,5 %, соответственно ($p < 0,05$), в то время как изменения этих показателей при монотерапии диклофенаком составили 19,2, 25,3, 21,9 и 24,2 %, соответственно ($p < 0,05$). На фоне дефицита H_2S в организме усиливался дисбаланс в системе про-антиоксидантных энзимов и накопление продуктов окисления липидов и белков, вызванные диклофенаком натрия. Предкондиционирование донором H_2S предотвращало негативное действие диклофенака на защитный потенциал желудка, состояние клеточных мембран, поскольку исследуемые показатели достоверно не отличались от параметров контрольной группы.

Показано, что в механизмах повреждающего действия диклофенака натрия лежит его способность снижать активность энзимов-продуцентов вазодилатирующих молекул (ЦГЛ, NO-синтазы и PGH-синтазы на 17-24%), а также содержание их метаболитов и сопровождается снижением чувствительности мезентериальной артерии к вазодилатирующему действию H_2S . Введение НПВС на фоне дефицита H_2S сопровождалось увеличением депримирующего влияния диклофенака натрия на продукцию исследуемых вазоактивных молекул и H_2S -индуцированную релаксацию мезентериальных артерий (EC_{50} увеличивалась на 27,5%). Введение животным диклофенака натрия на фоне избыточного количества H_2S практически полностью нивелировало негативное влияние исследуемого НПВС на образование NO, вазодилатирующих простагландинов, H_2S в СОЖ и процессы регуляции сократительной способности мезентериальной артерии при участии H_2S .

$NaHS$ выявил способность нивелировать изменения клеточного цикла и

предупреждать проапоптотический и антипролиферативный эффекты диклофенака натрия: показатель фрагментации ДНК был в 1,68 раза меньше, средний показатель S фазы – в 1,7, а показатель блока пролиферации - в 2,5 раз больше, по сравнению с монотерапией диклофенаком. В то же время у интактных крыс его введение не влияло на основные показатели клеточного цикла и фрагментацию ДНК в слизистой оболочке желудка.

Донор H_2S , в отличие от ингибитора его синтеза, обладает умеренным анальгетическим действием и выраженным противовоспалительным эффектом, повышает антиноцицептивный и антифлогенный эффекты диклофенака натрия.

Ключевые слова: гастротоксичность, диклофенак натрия, гидроден сульфид, пропаргилглицин, биохимические изменения, слизистая оболочка желудка, апоптоз.

SUMMARY

Taran I.V. Modulation of diclofenac sodium gastrototoxicity in a different level of saturation of the body with hydrogen sulfide (experimental research). - Manuscript.

Dissertation submitted for the Candidate of Medical Sciences Degree of in speciality 14.03.05 – Pharmacology. State organization “Institute of Pharmacology and Toxicology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv – 2016.

The thesis experimentally proved the new approaches to reduce diclofenac sodium gastrototoxicity through the study of changes in the protective properties of gastric mucosa and the pharmacological effects of the drug in a different saturation of the organism with hydrogen sulfide.

It was proved that the increase of H_2S content in the body had a protective effect and increased the protective potential of gastric mucosa. It was established that the deficit of H_2S increased, while the excess of it, on the contrary, reduced the degree of diclofenac sodium gastrototoxicity. The use of H_2S donor in conditionally therapeutic dose (1/20 of the LD_{50}) reduced the negative effect of diclofenac on stomach metabolism, the state of cell membranes and the contractility of mesenteric arteries, while the introduction of H_2S synthesis inhibitor potentiated the effect of gastrototoxicity of such NSAIDs. NaHS showed antiapoptotic effect and had a strong corrective action on changes in the indices of gastric mucosa cell cycle caused by diclofenac sodium.

It was found that hydrogen sulfide donor had moderate antinociceptive and expressive anti-inflammatory actions and reinforced anti-inflammatory and analgesic effects of diclofenac sodium.

Key words: gastrototoxicity, diclofenac sodium, hydrogen sulfide, propargilglycine, biochemical changes of gastric mucosa, apoptosis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

в/оч	– внутрішньочеревне введення;
в/шл	– внутрішньошлункове введення;
ГАГ	– глікозаміноглікани;
EC ₅₀	– середньоєфективна концентрація досліджуваної речовини;
КГП	– карбонільні групи протеїнів;
ЛД ₅₀	– середньосмертельна доза досліджуваної речовини;
МДА	– малоновий діальдегід;
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений;
НПЗЗ	– нестероїдні протизапальні засоби;
ППГ	– пропаргілгліцин;
СОД	– супероксиддисмутаза;
СОШ	– слизова оболонка шлунка;
ЦГЛ	– цистатіонін-гамаліаза;
H ₂ S	– гідроген сульфід;
NaHS	– натрію гідроген сульфід;
NO	– нітроген монооксид ;
NO-синтаза	– синтаза нітроген монооксиду;
PGH-синтаза	– простагландин-ендопероксид синтаза.

Підписано до друку 01.03.2016 р. Замовл. № 066.
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,9 Друк офсетний.
Наклад 100 примірників.

Вінниця. Друкарня ВНМУ ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

