ФОМЕНКО ІРИНА СТЕПАНІВНА. Назва дисертаційної роботи: "CИСТЕМИ НІТРОГЕНУ ОКСИДУ ТА ГІДРОГЕНУ СУЛЬФІДУ У МЕХАНІЗМАХ УШКОДЖЕННЯ СЛИЗОВОЇ ШЛУНКА ТА ТОВСТОЇ КИШКИ"

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

На правах рукопису

ФОМЕНКО ІРИНА СТЕПАНІВНА

УДК612.015.11(612.32+612.36):611-018.73].014.484

CИСТЕМИ НІТРОГЕНУ ОКСИДУ ТА ГІДРОГЕНУ СУЛЬФІДУ У

МЕХАНІЗМАХ УШКОДЖЕННЯ СЛИЗОВОЇ ШЛУНКА ТА ТОВСТОЇ

КИШКИ

03.00.04 – біохімія

дисертація на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

науковий консультант

Скляров Олександр Якович

д.мед.н., професор

Київ 2015

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 7

ВСТУП 9

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 19

1.1 Cучасні уявлення про біохімічні механізми цитопротекції та

ульцерогенезу в шлунку та товстій кишці 19

1.2 Роль газових медіаторів – нітрогену оксиду та гідрогену сульфіду у

регуляції цитопротекції та в ульцерогенезі в органах травного тракту 28

1.3 Значення системи ЦОГ/ПГ в механізмах цитопротекції та

ульцерогенезу в СОШ та СОТК 43

1.4 Роль ліпооксигеназного шляху обміну арахідонової кислоти в

механізмах цитопротекції та ульцерогенезу в травній системі 49

1.5 Генерація активних кисневих радикалів в СОШ та СОТК та роль

ферментів антиоксидантного захисту в їх знешкодженні 53

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 60

2.1 Об’єкти та умови дослідження 61

2.2 Моделювання ульцерогенних змін в СОШ та СОТК 61

2.2.1 Модель водно-іммобілізаційного стресу 62

2.2.2 Модель адреналін-індукованого стресу 62

2.2.3 Метод моделювання виразкового коліту 63

2.3 Серії досліджень 63

2.4 Методика відбору тканин та одержання гомогенатів СОШ та СОТК 69

2.5 Макроскопічні дослідження 70

2.6 Гістологічні дослідження 70

2.7 Біохімічні методи аналізу 71

2.7.1 Визначення вмісту білкав гомогенатах тканин 71

2.7.2 Визначення концентрації H2S в гомогенатах СОШ та СОТК 71

3

2.7.3 Визначення вмісту H2Sв сироватці крові 72

2.7.4 Визначення вмісту нітрит- та нітрат-аніону в гомогенатах СОШ та

СОТК 72

2.7.5 Визначення активності NO-синтаз в гомогенатах СОШ та СОТК 73

2.7.6 Визначення вмісту L-аргініну в сироватці крові 74

2.7.7 Визначення активності аргінази в гомогенатах СОШ та СОТК 74

2.7.8 Визначення активності мієлопероксидази в гомогенатах СОШ та

СОТК 75

2.7. 9 Визначення вмісту ТБК-активних продуктів у гомогенатах СОШ та

СОТК 75

2.7.10 Визначення активності супероксиддисмутази в гомогенатах СОШ

та СОТК 76

2.7.11 Визначення активності каталази 77

2.8 Методи імуноферментного аналізу. Визначення концентрації

кортизолу в сироватці крові 78

2.9 Методи молекулярної біології 79

2.9.1 Виділення РНК з гомогенатів СОШ і СОТК 79

2.9.2 Електрофоретичне розділення РНК в агарозному гелі та

спектрфотометричне визначення концентрації РНК 80

2.9.3 Зворотньотранскрипційна полімеразна ланцюгова реакція 80

2.10 Мікробіологічні методи аналізу 82

2.11 Статистичне опрацювання результатів досліджень 83

РОЗДІЛ 3

МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН, РОЛЬ NO- ТА Н2S-СИНТЕЗУЮЧИХ

СИСТЕМ УСОШ ТА СОТК ЗА УМОВ СТРЕСУ 84

3.1Роль газових медіаторів (NO та Н2S) та оксидативних процесів у

СОШ в розвитку патохімічних змін при ВІС та АІС 84

4

3.2 Дослідження впливу ВІС та АІС на показники систем NO/Н2S,

процеси ліпопероксидації, активність ферментів антиоксидантного

захисту в СОТК 99

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ЦОГ НА ПРОЦЕСИ УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ ТА

ЦИТОПРОТЕКЦІЇ В СОШ ТА СОТК 115

4.1 З’ясування ролі системи ЦОГ/ПГза умов впливу НПЗП різного

механізму дії на показники систем NO та Н2S та процесів

ліпопероксидації у СОШ 115

4.2 Дослідження впливу НПЗП на показники систем синтезу NO та Н2S,

процеси ліпопероксидації, активность ферментів антиоксидантного

захисту в СОТК 127

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ГАЗОВИХ МЕДІАТОРІВ В МЕХАНІЗМАХ

УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ ТА ЦИТОПРОТЕКЦІЇ В СОШ ТА СОТК ЩУРІВ ЗА

УМОВ ПОЄДНАНОГО ВПЛИВУ СТРЕСУ ТА НПЗП 137

5.1 Оцінка морфологічних змін, визначення ролі систем синтезу NO та

Н2S, процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту в СОШ за

умов поєднаного впливу ВІС та НПЗП 137

5.2 З’ясування ролі NO-синтазної системи в механізмах ульцерогенезу

та цитопротекції в СОШ при комбінованому впливі АІС та НПЗП 156

5.3 Гістологічні зміни, роль систем синтезу NO та Н2S, ліпопероксидації

антиоксидантного захисту в СОТК за умов комбінованого впливу ВІС та

НПЗП 167

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ ПОДВІЙНОЇ ЦОГ/ЛОГ ДІЇ НА ПРОЦЕСИ

УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ ТА ЦИТОПРОТЕКЦІЇ В СОШ ТА СОТК ЗА УМОВ

НОРМИ ТА СТРЕС-ІНДУКОВАНИХ ЗМІН 186

5

6.1 Стан NO-синтазної системи, вміст гідрогену сульфіду, інтенсивність

процесів ліпопероксидації та активність ензимів антиоксидантного

захисту в СОШ за умов подвійного інгібування ЦОГ/ЛОГ похідними

тіазолідинонів 186

6.2 Дослідження впливу інгібіторів подвійної ЦОГ/ЛОГ дії на біохімічні

механізми ульцерогенезу в СОШ за умов ВІС 195

6.3 З’ясування ролі NO-синтазної системи в механізмах ульцерогенезу

та цитопротекції в СОШ за умов комбінованого впливу АІС та

інгібіторів ЦОГ/ЛОГ 206

6.4 Дослідження впливу інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на показники систем

синтезу NO та Н2S, процеси ліпопероксидації, активність ензимів

антиоксидантного захисту в СОТК 216

6.5 Роль системи L-аргінін/NОS/NO, процесів ліпопероксидації,

антиоксидантного захисту та змін мікрофлори в СОТК за умов

комбінованого впливу ВІС та інгібування ЦОГ/ЛОГ 222

6.6 Вплив інгібіторів ЦОГ/ЛОГ та селективних ЦОГ-2 блокаторів на

рівень NO та інтенсивність процесів ліпопероксидації в СОШ за умов їх

тривалого введення 230

РОЗДІЛ 7

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ NO- ТА Н2S-СИНТЕЗУЮЧИХ ЕНЗИМІВ І

СИСТЕМ ЦОГ/ПГ ТА ЛОГ/ЛТ У СОТК ЗА УМОВ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ 239

7.1 Визначення показників обміну NO, Н2S та процесів ліпопероксидації

в СОТК за умов впливу НПЗП та експериментального виразкового

коліту 239

7.2. Вплив інгібіторів iNOS, 5-ЛОГ та ЦОГ/ЛОГ на морфологічний стан,

показники NO-синтазної системи та процеси ліпопероксидації в СОТК

щурів за умов експериментального виразкового коліту

253

6

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 263

ВИСНОВКИ 296

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 299

ДОДАТКИ 353

7

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АІС – адреналін-індукований стрес

АФК – активні форми кисню

АФН – активні форми нітрогену

ВІС – водно-іммобілізаційний стрес

КУО – колонієутворюючі одиниці

ЛОГ – ліпооксигеназа

ЛТ – лейкотрієни

НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати

ПАЛФ – піридоксальфосфат

ПГ– простагландини

СОД – супероксиддисмутаза

СОТК – слизова оболонка товстої кишки

СОШ– слизова оболонка шлунка

ТХА – трихлорацетатна кислота

ЦОГ – циклооксигеназа

ФАД – флавінаденіндинуклеотид

ФМН – флавінмононуклеотид

BH4 –5,6,7,8-тетрагідро-L-біоптерин

bFGF – основний фактор росту фібробластів

EGF – епідермальний фактор росту

TFF –низькомолекулярні фактори родини трефойлових пептидів

СВS– цистатіонін-β-синтетаза

CL –цистеїнліаза

CSE – цистатіонін-γ-ліаза

Н2S – гідрогену сульфід

3-MST – 3-меркаптопіруватсульфтрансфераза

8

NF-kB– ядерний фактор каппа-В

NO – нітрогену оксид

NOS– NO-синтаза

Nos2– ген, що кодує iNOS

nNOS– нейрональнаNO-синтаза

iNOS –індуцибельнаNO-синтаза

eNOS –ендотеліальнаNO-синтаза

Cbs– ген, що кодує цистатіонін-β-синтетазу у щурів

PAMP– патоген-асоційовані молекулярні чинники

Ptgs2– ген, що кодує ЦОГ-2

TLR – Toll-подібнірецептори

TGF – трансформуючий фактор росту типу 

PDGF – тромбоцитарний фактор росту

P-5׳-P – піридоксаль-5׳-фосфат

9

ВСТУП

Актуальність теми. Не зважаючи на успіхи сучасної клінічної

гастроентерології, виразкові захворювання травного тракту й надалі

залишаються широко поширеними, а дослідження біохімічних механізмів, що

лежать в основі ульцерогенних ушкоджень є актуальним питанням сучасної

науки [61; 71, 170, 261, 318, 415]. За даними МОЗ України у структурі

поширеності хвороб органів травлення пептична виразка шлунка та

дванадцятипалої кишки становить 12,83 %, у світі вона сягає до 20% населення.

Також значною є захворюванність на виразковий коліт [74, 373].

Не дивлячись на те, що патохімічні механізми, що призводять до

виразкових дефектів різних відділів травного тракту (шлунка, дванадцятипалої

та товстої кишки) мають особливості, основні причини їх розвитку подібні.

Зокрема, найпоширенішими чинниками агресії служать гострі та тривалі

психоемоційні перенапруження, застосування нестероїдних протизапальних

препаратів (НПЗП), порушення мікробіоценозу, зниження імунітету, а також

вживання алкоголю та нераціональне харчування [210, 221, 222, 287, 318, 415,

423, 462]. На сьогодні прийнято вважати, що основною причиною розвитку

виразкових захворювань шлунка та товстої кишки є порушення рівноваги між

ослабленими захисними чинниками травного тракту та дією факторів «агресії»

[75, 103, 220, 252]. Таким чином, дослідження молекулярно-біохімічних

механізмів цитопротекції та ульцерогенезу є надзвичайно актуальними.

У процесах ульцерогенезу, як при виразковій хворобі шлунка, так і при

неспецифічному виразковому коліті значну роль відіграють так звані газові

медіатори [120, 251, 294, 305, 433]. До останніх належать такі молекули, як

нітрогену оксид NO та гідрогену сульфід H2S. Упродовж останніх років їх роль

у функціонуванні травної системи активно вивчається [121, 122, 136, 189, 192,

435, 436, 442-444].

NO в слизовій оболонці шлунка (СОШ) та слизовій оболонці товстої

кишки (СОТК) за фізіологічних умов активно залучений до реалізації

10

механізмів цитопротекції та контролю таких функцій, як регуляція кровоплину,

секреції, моторики, водно-електролітного балансу, міжклітинної комунікації,

тощо [248, 259, 266, 280, 284, 335]. Різке зростання синтезу NO внаслідок

підвищення рівня експресії або активності індуцибельної ізоформи NO-синтази

(іNOS) служить передумовою розвитку виразкових ушкоджень СОШ чи СОТК

[50, 70, 110, 146, 175]. Про-ульцерогенна роль NO, головним чином, пов’язана з

утворенням вільних радикалів нітрогену, що чинять цитотоксичну дію,

взаємодіючи з білками та нуклеїновими кислотами [218, 265, 281, 349]. З

іншого боку, NO, синтезований конститутивними ізоформами NO-синтази

(сNOS), так і як iNOS, відіграє важливу роль у механізмах загоювання виразок

[52, 70, 264]. Зниження продукції NO також розглядають як чинник

виразкоутворення, оскільки він пов'язаний із вазоконстрикцією та втратою

регуляторних функцій нітрогену оксид [136, 256, 372, 389].

Інший газовий медіатор, H2S, за умов норми бере активну участь у

механізмах захисту СОШ та СОТК від чинників агресії, діючи як

вазодилятатор, нейромодулятор [152, 294, 306, 447]. Окрім цього, H2S володіє

антиоксидантною, антиапоптичною та протизапальною дією не лише у

травному тракті, але й у інших тканинах [76, 114, 122, 289, 358, 361]. Зниження

продукції ендогенного H2S в СОШ та СОТК при дії різних ульцерогенних

чинників розглядають, як одну із ланок ульцерогенезу, оскільки відбувається

втрата цитопротективних властивостей цього газотрансміттера [161, 229, 298]. З

іншого боку, значне зростання його продукції зумовлює інгібування

дихального ланцюга мітохондрій, порушення регуляції тканинної проліферації,

чинить генотоксичний ефект [294, 325, 361, 449].

Враховуючи залежність про- чи антиульцерогенних ефектів NO та H2S від

їх концентрації в органах травної системи, важливого значення набуває

з’ясування особливостей регуляції експресії та активності ферментів їх синтезу

в СОШ та СОТК, а також дослідження молекулярних механізмів взаємозв’язку

метаболічних шляхів цих двох медіаторів. Нещодавніми дослідженнями

показано, що як H2S може чинити вплив на активність NO-синтаз (NOS), так і

11

NО може регулювати функціонування H2S-синтезуючих ферментів [258, 322].

Проте дані щодо молекулярних механізмів зазначеного взаємозв’язку, а також

його роль у регуляції цитопротекції та ульцерогенезу в шлунку та товстій

кишці суперечливі, у наслідок чого питання залишається актуальним.

Недостатньо дослідженою є метаболічна взаємодія між ферментами

синтезу газових медіаторів та системами циклооксигенази

(ЦОГ)/простагландини (ПГ) та ліпооксигенази (ЛОГ)/лейкотрієни (ЛТ) [139,

326, 438]. Молекулярно-біохімічне підґрунтя такої взаємодії потребує

поглиблених досліджень.

Зважаючи на ці обставини, актуальною проблемою є дослідження ролі

газових медіаторів NO та H2S у взаємозв’язку з функціонуванням систем

ЦОГ/ПГ та ЛОГ/ЛТ у молекулярно-біохімічних механізмах стрес- та НПЗПіндукованого ульцерогенезу в СОШ та СОТК.

Зв'язок теми з науковими програмами, планами, темами. Тема

докторської дисертації затверджена на засіданні Вченої Ради

Львіськогонаціонального медичного університету імені Данила Галицького

МОЗ України 18 лютого 2015 р. Дисертаційна робота є фрагментом

комплексних тем кафедри біохімії Львіського національного медичного

університету імені Данила Галицького «Клініко-експериментальні

обґрунтування моніторингу діагностики та лікування захворювань травної

системи та гепатопатій», № державної реєстрації 0100U002267, «Клінікоекспериментальне обґрунтування моніторингу, діагностики та

стандартизованих методів лікування метаболічних захворювань внутрішніх

органів та їх ускладнень», № державної реєстрації 0110U001641 та

«Дослідження ролі газових медіаторів у процесах цито- та органопротекції та

оцінка дії нових протипухлинних препаратів» № державної реєстрації

0115U00040.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було визначити

взаємозв’язки між системами синтезу нітрогену оксиду та гідрогену сульфіду,

з’ясувати роль вказаних газових медіаторів у механізмах виразкоутворення та

12

цитопротекції в слизових оболонках шлунка і товстої кишки за умов дії різних

ульцерогенних чинників у щурів.

Завдання досліджень були наступними:

1. Провести порівняльний аналіз морфологічних змін, з’ясувати особливості

функціонування NO-синтазної системи, роль процесів ліпопероксидації та

активності ферментів антиоксидантного захисту в СОШ і СОТК за умов стресіндукованого ульцерогенезу.

2. Встановити взаємозв’язки метаболізму NO та H2S за умов дії різних за

структурою інгібіторів ЦОГ для виявлення змін їх концентрації, особливостей

морфологічного стану, показників системи L-Аргінін/NOS/NO, активності

аргінази, мієлопероксидази та ступеня оксидативного стресу в СОШ та СОТК.

3. Визначити зміни рівня експресії генів Nos2, Cbs, Ptgs2, морфологічний

стан СОШ та СОТК, рівень нітрозо-оксидативних процесів та концентрації H2S

за умов поєднаного впливу стресу різного генезу (водно-іммобілізаційного та

адреналін-індукованого) та НПЗП у СОШ та СОТК.

4. З’ясувати участь змін видового складу мікрофлори у механізмах

ульцерогенезу за умов впливу стресу, одночасної дії стресу та НПЗП у товстій

кишці.

5. Визначити роль системи ЛОГ/ЛТ у формуванні морфологічних змін,

функціонуванні системи системи L-Аргінін/NOS/NO, змінах концентрації H2S

та розвитку оксидативного стресу у СОШ та СОТК за умов комбінованого

впливу ЦОГ/ЛОГ інгібіторів та стрес-індукованого ульцерогенезу.

6. З’ясувати особливості змін процесів ліпопероксидації, активності

ферментів антиоксидантного захисту в СОШ при тривалому інгібуванні ЦОГ-2

целекоксибом та використанні інгібіторів ЦОГ/ЛОГ.

7. Визначити участь систем синтезу H2S та NO та їх роль у механізмах

виразкоутворення в СОТК за умов експериментального гострого коліту.

Об’єкт дослідження – молекулярно-біохімічні процеси синтезу та дії NO

та H2S в СОШ та СОТК за умов норми, при стрес- і НПЗП-індукованому

ульцерогенезі та експериментальному виразковому коліті у щурів.

13

Предмет дослідження – особливості стану NO- та H2S-синтезуючих

систем, процесів ліпопероксидації, активності ферментів антиоксидантного

захисту, зміни мікрофлори товстої кишки за умов впливу стресу, НПЗП,

інгібування iNOS та ЦОГ/ЛОГ, моделювання експериментального коліту.

Методи дослідження. У роботі використано біохімічні

(спектрофотометричне визначення активності ензимів: NO-синтаз, аргінази,

мієлопероксидази, СОД та каталази; концентрації H2S, нітрит-аніону та суми

нітрит-аніону та нітрат аніону, вмісту ТБК-активних продуктів в гомогенатах

СОШ та СОТК, а також концентрації L-аргініну та H2S в сировитці крові),

морфологічні (макроскопічний, гістологічний, морфометричний), імунохімічні

(імуноферментний аналіз), молекулярно-біологічні (зворотно-транскрипційна

полімеразна ланцюгова реакція), мікробіологічні (культуральний метод) та

статистичні методи аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті проведених

комплексних досліджень отримано нові дані, що суттєво доповнюють існуючі

уявлення щодо ролі NO та H2S у молекулярно-біохімічних механізмах розвитку

ульцерогенних ушкоджень СОШ та СОТК.

Вперше показано, що шляхом вивільнення H2S, інгібітор ЦОГ – АТВ-346

та блокатор ЦОГ/ЛОГ – сполука (5-(3,5-дитербутил-4-гідроксибензиліден)-2-

тіоксотіазолідин-4-он) викликають зниження гастротоксичності на тлі стресіндукованого ульцерогенезу. Доведено, що H2S, вивільнений із цих засобів,

чинить регулюючий вплив на показники NO-синтазної системи (рівень

стабільних метаболітів NO, експресію генів та активність NO-синтаз), що

розкриває біохімічні механізми взаємозв’язку між NO та H2S.

Вперше відзначено, що у механізмі потенціювання ульцерогенезу в СОШ

за умов комбінованого впливу ВІС та неселективного інгібітора ЦОГ

напроксену провідна роль належить суттєвому зниженню експресії гена Nos2

та активності iNOS, що доводить наявність взаємозв’язків між системами ЦОГ1,2/ПГ та NOS/NO при формуванні деструктивних ушкоджень слизової

оболонки.

14

Виявлено, що не зважаючи на різний морфологічний стан СОШ та СОТК

за умов моделювання стрес- та НПЗП-індукованого ульцерогенезу, біохімічні

показники обміну NO, H2S та рівень процесів ліпопероксидації змінюються

практично паралельно, що свідчить про вагому роль газових медіаторів та

оксидативного стресу в виразкоутворенні в обидвох досліджуваних тканинах. З

іншого боку, відсутність структурно-геморагічних ушкоджень в СОТК при

наявності таких в СОШ доводить вищий рівень захисних механізмів в цій

товстій кишці.

Показано, що за умов комбінованого впливу стресу та НПЗП при

відсутності видимих макроскопічних змін в СОТК відбувається активація

процесів ліпопероксидації та зниження активності ферментів антиоксидантного

захисту, що свідчить про розвиток оксидативного стресу. Доведено, що за

таких умов знижується експресія гена Cbs та концентрація H2S в СОТК. При

цьому суттєво змінюється видовий склад мікрофлори в бік зростання

популяційного вмісту Escherichia coli та Clostridium spp. Уся перелічена низка

подій створює передумови для порушення слизового бар’єру та формування

виразкових ушкоджень в СОТК.

Доведено, що у біохімічних механізмах стрес- та НПЗП-індукованого

ульцерогенезу в СОШ та СОТК за умов дії інгібіторів ЦОГ (ЦОГ-1/ЦОГ-2,

ЦОГ-2) та інгібіторів подвійного ЦОГ-2/5-ЛОГ впливу, провідну роль відіграє

система ЦОГ-1/ПГ, тоді як значення ЛОГ/ЛТ не є вирішальним, про що

свідчить однаковий напрямок змін показників систем синтезу NO та H2S при

застосуванні НПЗП та похідних тіазолідинонів.

Вперше показано, що за умов одночасного блокування ЦОГ/ЛОГ при

експериментальному коліті відбувається активування біохімічних механізмів

цитопротекції, що проявляються зменшенням активності iNOS, концентрації

нітрит-аніону та ТБК-активних продуктів і, як наслідок, зниженням рівня

деструктивних ушкоджень в СОТК. Підтверджено, що блокування iNOS

зумовлює різке зниження нітрозо-оксидативних процесів і, як наслідок, чинить

15

цитопротекторний ефект, що доводить вагому роль iNOS у механізмах розвитку

коліту.

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень

мають вагоме значення як для теорії, так і практичної медицини. Поглиблені

теоретичні уявлення та положення щодо біохімічних механізмів розвитку

процесів ульцерогенезу у шлунку та товстій кишці при дії стресу та

експериментального коліту з акцентуванням уваги на ролі NO-синтаз, систем

циклооксигенази/простагландини та ліпооксигенази/лейкотрієни. Виявлені

особливості дії НПЗП мають значення для практичної гастроентерології для

індивідуалізації лікування пацієнтів.

Застосований методичний підхід, який базується на використанні

біохімічних, молекулярних, морфологічних та мікробіологічних досліджень

може бути використаний у науково-дослідній роботі при плануванні

досліджень.

Матеріали дисертації впроваджені в навчальний процес кафедри медичної

біохімії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет» імені І.Я.

Гобачевського МОЗ України; кафедри медичної, біоорганічної та біологічної

хімії ДВНЗ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава;

кафедри біологічної хімії Національного фармацевтичного університету м.

Харків.

Отримані результати стосовно зниженої гастротоксичності та впливу на

показники NO-синтазної системи та процеси ліпопероксидації інгібіторів

подвійної ЦОГ/ЛОГ дії, що вивільняють H2S, дають біохімічне підґрунтя для їх

впровадження в медичну практику для лікування запальних захворювань,

зниження частоти ускладнень та матиме економічний ефект стосовно витрат

коштів на лікування при перебуванні хворих у стаціонарі.

Дані стосовно впливу інгібіторів, спроможних одночасно інгібувати ЦОГ

та ЛОГ на морфологічний стан та біохімічні показники при

експериментальному коліті дозволяють рекомендувати їх для проведення

подальшої клінічної апробації.

16

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене

дослідження, виконане автором відповідно до програми експериментальних

досліджень, спланованих, проведених і узагальнених впродовж 2007-2015 рр.

Дисертантом особисто розроблена методологія експериментальних досліджень,

сформульовані положення дисертації, проведений пошук та аналіз літератури.

Всі експерименти виконувались здобувачем особисто або за безпосередньої

участі. Дисертантом не було використано ідей співавторів публікацій. Аналіз та

інтерпретація одержаних результатів, викладення висновків дисертаційної

роботи обговорювалися з науковим консультантом, д.мед. н., проф. Скляровим

О.Я.

Морфологічна оцінка змін СОШ та СОТК була проведено разом проф.

кафедри гістології ЛНМУ імені Данила Галицького д.мед.н. Ященко А.М.

Молекулярно-біологічні дослідження здійснено разом з молодшим науковим

співробітником навчально-наукового центру «Інститут біології» біологічного

факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка

к.б.н. Дранициною А.С. Мікробіологічні дослідження проведено спільно зі

співробітниками кафедри мікробіології ЛНМУ імені Данила Галицького

(д.мед.н., проф. Корнійчук О.П., ас. Гураль А.Р.). Синтез сполук подвійного

інгібування ЦОГ/ЛОГ для проведення досліджень їх впливу на механізми

ульцерогенезу в СОШ та СОТК було здійснено співробітниками кафедри

біоорганічної, органічної та фармацевтичної хімії ЛНМУ імені Данила

Галицького (д.фарм.н., проф. Лесик Р.Б., к.фарм.н., доц. Гаврилюк Д.Я.) і

люб’язно передані нам для дослідження.

Співучасть співробітників кафедри біохімії ЛНМУ імені Данила

Галицького у виконанні роботи висвітлена в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної

роботи доповідались та обговорювались на вітчизняних та зарубіжних

наукових конференціях та конгресах серед яких: New Frontiers in Cardiovascular

Research (Krakow, Poland, 2007), 5

th International Sympsium on cell/tissue injury

and cytoprotection/organoprotection (м.Ялта, Україна, 2008), 16th United European

17

Gastroenterology Week (Vienna, Austria, 2009), VII Parnas conference on

biochemistry and molecular biology (м.Ялта, Україна, 2009), Міжнародна

конференція «Bridgesinlifesciences 5-th Annual Scientific Meeting and 10-th

RECOOP Strategic Alliance meeting» (Львів, Україна, 2010), 6-th Lviv – Lublin

conference of experimental and clinical Biochemistry (Lublin, Poland, 2010), XVIII

з’їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Одеса,

Україна, 2010), Конференція Львівського відділення Українського біохімічного

товариства і біохімічної комісії НТШ, (Львів, Україна, 2011), Міжнародна

конференція «Bridges in life sciences 6-th Annual Scientific Meeting RECOOP»

(Братислава, Словаччина 2011), 4th International Scientific Conference “Advances

in pharmacology and pathology of the digestive tract” (м. Київ, Україна, 2012); 7

th

Lviv-Lublin conference of еxperimental and сlinical biochemistry (Львів, Україна,

2013), The 8th International Symposiumon Cell/Tissue Injury and

Cytoprotection/Organoprotection (Budapest, Hungary, 2014), Конференція

Львівського відділення Українського біохімічного товариства і біохімічної

комісії НТШ (Львів, Україна, 2015), XIX з’їзд Українського фізіологічного

товариства з міжнародною участю (Львів, Україна, 2015).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковані в 46

наукових працях. З 26 представлених статей: 7 публікацій у міжнародних

часописах, 15 опубліковані у фахових виданнях України, 4 – у інших виданнях.

20 тез доповідей на наукових з’їздах, конгресах, конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 356

сторінках тексту і складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і

методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення

результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури

(473 найменувань) та додатків. Робота містить 23 таблиці та проілюстрована

255 рисунками.

ВИСНОВКИ

Удисертаційнійроботівідповіднодопоставленоїметиізавдань

отриманоновіданіякіпослужилипідґрунтямдляформулюваннянової

науковоїгіпотезивзаємодіїсистемсинтезугазовихмедіаторівтаза

умоврозвиткуульцерогеннихушкодженьСОШтаСОТКпоказаноїхзвязокз

системамиЦОГПГтаЛОГЛТоціненоучастьзатакихумовферментів

антиоксидантногозахистутапроцесівліпопероксидаціївиявленопереваги

використаннявивільняючихінгібіторівЦОГЛОГ

Встановленощозмінибіохімічнихпоказниківзаумовмоделювання

стресіндукованогоульцерогенезуВІСрізноїтривалостітаАІСбули

подібнимивСОШтаСОТКіхарактеризувалисьзниженнямрівняекспресії

генатавідповідносинтезузростаннямрівняекспресіїгената

активностіпідвищеннямрівняекспресіїгенатаактивності

мієлопероксидазизростаннямінтенсивностіпроцесівліпопероксидації

Доведенощоключовимиметаболічнимиподіямищозумовлюють

ульцерогенезвСОШзатакихумовслугуютьоксидативнонітративнийстрес

тазниженнясинтезуендогенного

ПоказанощозаумовнеселективногоінгібуванняЦОГприВІС

відбувалосяпотенціюванняульцерогенезувСОШпровіднарольуякому

належалазниженнюекспресіїгенавразиР≤таактивності

уразівР≤Отриманірезультатидоводятьіснуваннявзаємозв’язкуміж

системамиЦОГПГтазв’язанийНПЗПАТВзааналогічних

умовдемонструвавзниженугастротоксичністьщопроявляласьусуттєвому

зниженніплощіСГУтаІДУтазниженніактивностімієлопероксидазив

разиРщодоводитьцитопротективнівластивості

ДоведенощоубіохімічнихмеханізмахстрестаНПЗПіндукованого

ульцерогенезувСОШтаСОТКзаумоввпливублокаторівЦОГЦОГЦОГЦОГтаінгібіторівподвійноїЦОГЛОГдіїпровіднурольвідіграє



системаЦОГПГтодіякзначенняЛОГЛТєменшвирішальнимпрощо

свідчитьодноспрямованістьзмінпоказниківсистемсинтезута

ПоказанощоінгібуванняЦОГнапроксеномнатліВІСтазниження

утворенняякиймаєбактерициднудіюзумовлювализмінипопуляційних

рівнівосновнихсимбіонтівтовстоїкишкищохарактеризувалисьзростанням

кількостіентерококівудистальнійїїчастинізниженнямкількіснихпоказників

клостридіальноїмікрофлориудистальномувідділітовстоїкишкищоє

передумовоюрозвиткудисбіозутаформуваннявиразковихушкодженьтовстої

кишки

ДоведенощоінгібіторподвійноїЦОГЛОГдії–сполуказа

рахуноквивільненнячинилацитопротективнийефектзаумов

моделюваннястресіндукованогоульцерогенезущопроявлявсяузбереженні

цілісностіслизовогобар’єруСОШтаСОТКзниженніактивностіактивності

імієлопероксидазиВведеннянатліВІСзумовлювало

підвищенняпопуляційногорівнябіфідоталактобактерійтаповертало

значенняконцентраціїентерококівдоконтрольнихвеличинутовстійкишці

ВстановленощорозвитокдеструктивнихзмінуСОТКзаумов

експериментальноговиразковогоколітусупроводжувавсязниженнямекспресії

генатаконцентраціївсироватцікровісуттєвимзростаннямрівня

експресіїгенатаактивностівразівР≤зростаннямрівня

експресіїгенаактивуваннямпроцесівліпопероксидаціїтавірогідним

зростаннямактивностімієлопероксидазиСОДтакаталази

Використаннязв’язаногоАТВнатліекспериментального

виразковогоколітуприводилодосуттєвогопокращенняморфологічноїкартини

СОТКРівеньекспресіїмРНКгенаприцьомубувдостовірновищимніжза

умоввведеннянапроксенузааналогічнихумовАТВзумовлювавзниження

рівняекспресіїмРНКгенівтаактивностімієлопероксидази

таконцентраціїТБКактивнихпродуктіввСОТК

Порівняльнийаналіззмінбіохімічнихпоказниківзаумовзастосування

засобівщовивільняють–АТВтасполукинамоделяхВІСта



АІСпродемонструвавперевагиподвійногоЦОГЛОГінгібіторапохідного

тіазолідинонівщоокрімпротизапальноївластивостіволодівантиоксидантною

дієюЦіпрепаратиєпотенційниминовимизасобамищоможуть

використовуватисявпрактичніймедицині

Показанощомоделюваннягострогоколітушляхомвведенняацетатної

кислотисупроводжуєтьсязниженнямрівняекспресіїгенатаконцентрації

ВведеннязатакихумовАТВчинитьцитопротективнийефект

знижуючиплощутаіндексураженьактивністьмієлопереоксидази

інтенсивністьпроцесівліпопероксидаціїтазабезпечуючисталийрівень