

© Склярів П.О.

УДК 616.348-002-092:[616.345-018.73-092

Склярів П.О.

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ІЗОФОРМ ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ У ПАТОГЕНЕЗІ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ У ЩУРІВ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

sklyarovp777@gmail.com

Дослідження є фрагментом компл ексної між-кафедральної теми Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Клініко-експериментальні обґрунтування моніторингу діагностики та лікування захворювань органів травної системи та гепатопатій», № державної реєстрації 0100U002267.

Вступ. Відомо, що розвиток виразкового коліту супроводжується підвищенням інфільтрації слизової оболонки товстої кишки (СОТК) нейтрофілами та моноцитами, які при активації виділяють прозапальні цитокіни – TNF- α , IFN- γ , IL-1 β та кисневі радикали, внаслідок чого підвищується експресія індукцибельної ізоформи циклооксигенази (ЦОГ) – ЦОГ-2, зростають процеси ліпопероксидації, тощо [8, 10]. Значення ізоформ ЦОГ у розвитку виразкових ушкоджень у товстій кишці, залишається не достатньо з'ясованим. з одного боку, було показано, що інгібування ЦОГ посилює виразковий ушкодження СОТК [5], іншими дослідженнями продемонстровано, що блокування ЦОГ-2 зменшувало ступінь структурно-геморагічних уражень СОТК, інфільтрацію нейтрофілами та рівень IL-1 β [9].

Мета роботи – дослідити вплив інгібіторів ЦОГ на морфологічний стан СОТК та зміни показників ліпопероксидації при експериментальному виразковому коліті у щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження виконано на 50 щурах згідно з міжнародними умовами проведення експериментів з лабораторними тваринами. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію, для проведення дослідів тварин брали натще, забезпечували безперешкодний доступ до води. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Тварин було розподілено на 5 груп, що включали:

- 1) контрольну групу;
- 2) тварини, яким моделювали коліт шляхом введення 4% ацетатної кислоти у товсту кишку за методом Myers [7];
- 3) щурі, яким на тлі коліту вводили неселективний інгібітор ЦОГ – напроксен;
- 4) щурі, які на тлі коліту отримували інгібітор ЦОГ сполуку АТВ-346, що є модифікованою формою напроксену, спроможною вивільняти H₂S в травній системі;

5) тварини, які на тлі коліту отримували селективний інгібітор ЦОГ-2 – целекоксиб.

Усі досліджувані інгібітори ЦОГ вводили в дозі 10 мг/кг per oz за 30 хв до моделювання коліту.

На тлі знеболювання тіопенталом натрію (40 мг/кг) тварин декапітували, розрізали передню черевну стінку по білій лінії живота, виділяли товсту кишку. Для дослідження брали ділянку кишки від сліпої до прямої, розтинали її вздовж, промивали фізіологічним розчином і при транслюмінаційному освітленні визначали площу та ступінь структурно-геморагічних ушкоджень.

в гомогенатах СОТК визначили інтенсивність процесів ліпопероксидації оцінювали на основі вмісту продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) за методом Р.А. Тимирбулатова та Е.И. Селезнева [1] та активність супероксиддисмутази [2].

Результати оброблено з використанням пакету Statistika 7,0 ANOVA з апостеріорним попарним порівнянням груп.

Результати досліджень та їх обговорення.

Введення 4% розчину ацетатної кислоти призводило до розвитку структурно-геморагічних уражень товстої кишки з наявністю виразкових дефектів, ерозій, масивних і крапкових крововиливів. Загальна площа структурно-геморагічних ушкоджень (СГУ) складала 77,2 \pm 25,1 мм² (**рис. 1- А**), індекс деструктивних уражень (ІДУ) становив – 4,6 \pm 0,69 бали (**рис. 1- В**). Введення неселективного інгібітора ЦОГ напроксену в дозі 10 мг/кг на тлі впливу ацетатної кислоти не потенціювало ульцерогенезу, проте й не чинило цитопротективного ефекту. За таких умов загальна площа СГУ складала 73,2 \pm 11,1 мм², ІДУ склав – 4,0 \pm 0,52 бали.

Використання сполуки АТВ-346 на тлі експериментального виразкового коліту суттєво покращувало морфологічний стан СОТК. За таких умов поверхня СОТК залишалась сильно гіперемованою, проте площа та ІДУ виразкових ушкоджень був значно нижчим, порівняно як з показниками при коліті, так і з дією напроксену на тлі коліту. Оскільки АТВ-346 є похідним від напроксену, що відрізняється від «батьківської» молекули можливістю вивільняти H₂S, то усі ефекти, що відрізняють АТВ-346 та напроксен, зумовлені саме впливом H₂S. Тому, можна зробити висновок про цитопротективну дію цього «газового медіатора» за умов експериментального виразкового коліту, що узгоджується з даними літератури [3, 4, 6].

Блокування ЦОГ-2 целекоксибом призводило до зниження площі деструктивних ушкоджень СОТК на 20% (P \leq 0,01) та ІДУ на 35% (P \leq 0,01). Целекоксиб, володіючи протизапальною дією, інгібував ЦОГ-2

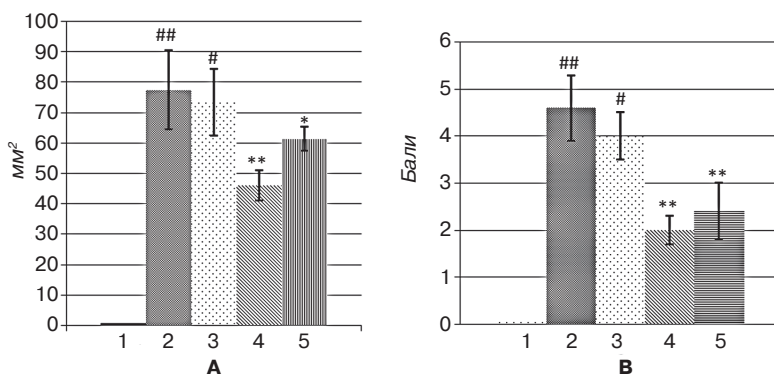


Рис. 1. Площа (у мм²) – А та індекс СГУ (у балах) – в у СОТК щурів за умов впливу інгібіторів ЦОГ на тлі коліту: 1 – тварини контрольної групи; 2 – коліт; 3 – вплив напроксену на тлі коліту; 4 – дія АТВ-346 на тлі коліту; 5 – вплив цефекоксиду на тлі коліту.
Примітка: * – P≤0,05, ** – P≤0,01 порівняно з показниками при коліті; # – P≤0,05, ## – P≤0,01 порівняно з показниками інтактних тварин.

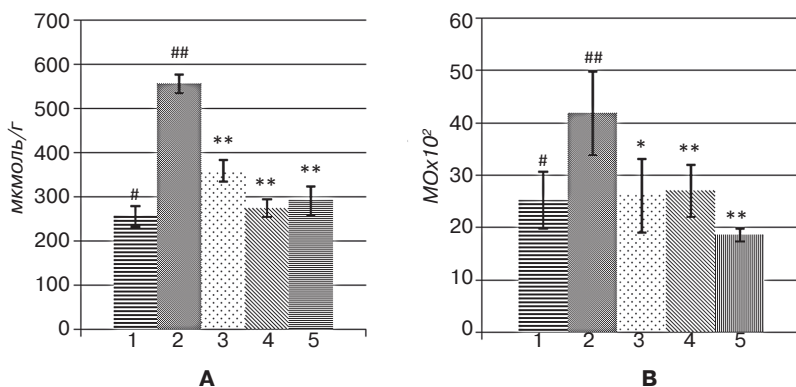


Рис. 2. Концентрація ТБК-активних продуктів (А) та активність супероксиддисмутази (В) у гомогенатах СОТК за умов впливу інгібіторів ЦОГ на тлі коліту: 1 – тварини контрольної групи; 2 – коліт; 3 – вплив напроксену на тлі коліту; 4 – дія АТВ-346 на тлі коліту; 5 – вплив цефекоксиду на тлі коліту.
Примітка: ** – P≤0,01 порівняно з показниками при оцтовому коліті; ## – P≤0,01 порівняно з показниками інтактних тварин.

та синтез нею ПГ, медіаторів запалення при виразковому коліті, проте зниження площі СГУ та ІДУ за умов його впливу було менш вираженим, ніж при дії АТВ-346.

В результаті моделювання виразкового коліту спостерігали значне посилення процесів ліпопероксидації в СОТК, про що свідчило зростання удвічі (P≤0,01) концентрації ТБК-активних продуктів (рис. 2-А). Використання усіх досліджуваних інгібіторів ЦОГ призвело до статистично достовірного зниження їх рівня,

що може бути свідченням того, що ендогенні простагландини, що синтезуються ЦОГ-1 та ЦОГ-2 відіграють роль у перебігу оксидативних процесів. Серед досліджуваних препаратів найбільш виражений ефект чинив АТВ-346.

Відповідно до зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації в СОТК при експериментальному оцтовому коліті зростала активність СОД на 66% (P≤0,01 (рис. 2-В)). Застосування напроксену, АТВ-346 та цефекоксиду на тлі впливу оцтового коліту знижувало активність СОД на 36, 35 та 56%, відповідно, порівняно до самостійного впливу 4% ацетатної кислоти. Отже, інгібування ЦОГ знижувало інтенсивність процесів ліпопероксидації, що супроводжувалось зниженням вмісту ТБК-активних продуктів та зменшенням активності СОД.

Отримані результати впливу НПЗП на біохімічні процеси в СОТК за умов моделювання експериментального коліту можуть бути узагальнені в наступних **висновках**:

- Використання АТВ-346 на тлі експериментального виразкового коліту зумовлювало суттєве покращення морфологічної картини, що супроводжувалось зниженням площі та ІДУ СГУ в СОТК, при цьому цитопротективний ефект цього засобу був більш виражений, ніж напроксену чи цефекоксиду.

- АТВ-346 за рахунок вивільнення H₂S проявив протизапальну та антиоксидантну дії при оцтовому коліті, що супроводжувались зниженням концентрації ТБК-активних продуктів та активності СОД в СОТК.

Перспективи подальших досліджень. Серед подальших напрямків дослідження перспективним є вивчення впливу різних H₂S – вміщуючих препаратів на процеси цитопротекції за умов виразкового коліту.

Література

1. Тимурбулатов М.А. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / М.А. Тимурбулатов, Е.И. Селезнев // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 209-211.
2. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте / С. Чевари, Т.Д. Андял, Д. Штиренгер // Лабораторное дело. – 1991. – № 10. – С. 9-13.
3. Blackler R.W. Hydrogen sulphide protects against NSAID-enteropathy through modulation of bile and the microbiota / R.W. Blackler, J.P. Motta, A. Manko [et al.] // Br. J. Pharmacol. - 2015. – Vol. 172, № 4. – P. 992-1004.
4. Flannigan K.L. Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific pro-resolution mechanism / K.L. Flannigan, J.G. Ferraz, R. Wang [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 8. – P. e71962.
5. Martin A.R. The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice / A.R. Martin, I. Villegas, C. Alarcon de la Lastra // Inflamm. Res. – 2005. – Vol. 54, № 4. – P. 145-15.

- Motta J.P. Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production / J.P. Motta, K.L. Flannigan, T.A. Agbor [et al.] // *Inflamm Bowel Dis.* – 2015. – Vol. 21, № 5. – P. 1006-1017.
- Myers B.S. Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats / B.S. Myers, J.S. Martin, D.T. Dempsey [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1997. – Vol. 273. – P. 928-936.
- Hosoi T. Role of nitric oxide synthase inhibitor in experimental colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid in rats / T. Hosoi, H. Goto, T. Arisawa [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2001. – Vol. 28, № 1-2. – P. 9-12.
- Reuter B.K. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2 / B.K. Reuter, S. Asfaha, S. Buret [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98, № 9. – P. 2076-2085.
- Sklyarov A.Ya. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis / A.Ya. Sklyarov, N.B. Panasyuk, I.S. Fomenko // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 62, № 1. – P. 65-73.

УДК 616.348-002-092:[616.345-018.73-092

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ІЗОФОРМ ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ У ПАТОГЕНЕЗІ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ У ЩУРІВ Склярів П.О.

Резюме. Досліджена дія різних інгібіторів ЦОГ на морфологічний стан слизової оболонки товстої кишки (СОТК) та показники ліпопероксидації при експериментальному виразковому коліті у щурів. Відзначено, що використання АТВ-346 на тлі експериментального виразкового коліту зумовлювало суттєве покращення морфологічної картини, що супроводжувалось зниженням площі та індексу деструктивних уражень СОТК, при цьому цитопротективний ефект цього засобу був більш виражений, ніж напроксену чи целекоксибу. АТВ-346 за рахунок вивільнення H_2S проявив протизапальну та антиоксидантну дію при експериментальному коліті, що супроводжувались зниженням концентрації ТБК-активних продуктів та активності СОД в СОТК.

Ключові слова: виразковий коліт, циклооксигеназа, нестероїдні протизапальні препарати, оксидативні процеси.

УДК 616.348-002-092:[616.345-018.73-092

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИЗОФОРМ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА У КРЫС

Склярів П.А.

Резюме. Исследовано действие разных ингибиторов ЦОГ на морфологическое состояние слизистой оболочки (СОТК) толстой кишки и показатели липопероксидации при экспериментальном язвенном колите у крыс. Показано, что действие АТВ-346 на фоне экспериментального язвенного колита приводит к значительному улучшению морфологической картины, что сопровождается снижением площади и индекса деструктивных изменений СОТК, при этом цитопротекторный эффект этого препарата был более выраженным, чем напроксена или целекоксиба. АТВ-346 за счет выделения H_2S проявлял противовоспалительное и антиоксидантное действие при экспериментальном колите, что сопровождалось снижением концентрации ТБК-активных продуктов и активности СОД в СОТК.

Ключевые слова: язвенный колит, циклооксигеназа, нестероидные противовоспалительные препараты, оксидативные процессы.

UDC 616.348-002-092:[616.345-018.73-092

Evaluation of the Role of Cyclooxygenases in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis Sklyarov P.O.

Abstract. The role of cyclooxygenases (COX) in the development of ulcerative lesions in colon is still not fully elucidated. On one hand, COX inhibition was shown to exacerbate ulcerative lesions of the colonic mucosa (CM) but other studies demonstrated that COX-2 blokage decreased the degree of structural and hemorrhagic lesions of CM, leukocytes infiltration and level of IL-1 β .

The aim of the study was to evaluate the impact of COX inhibitors on the morphologic status of CM and changes of lipid peroxidation indices in experimental ulcerative colitis in rats.

The studies were conducted on 50 rats, divided into 5 groups: 1) control group; 2) animals with modeled colitis by means of the injection of 4% acetic acid into the colon; 3) rats, administered nonselective COX inhibitor naproxen on the background of colitis; 4) rats, administered a compound АТВ-346, COX inhibitor, that is a modified form of naproxen, able to release H_2S in gastrointestinal tract; 5) animals, administered selective COX-2 inhibitor celecoxib. All investigated COX inhibitors were injected in dose 10 mg/kg per os 30 min prior to modeling of colitis.

On the background of anesthesia (sodium thiopental 40 mg/kg) animals were decapitated, area and severity of structural and hemorrhagic damage (SHD) of CM were assessed and in CM homogenates products of thiobarbituric acid (TBA) and activity of superoxide dismutase were determined. Results were processed using Statistika 7.0 ANOVA software.

Introduction of 4% solution of acetic acid resulted in the development of destructive lesions of CM with the presence of ulcerative defects, erosions, massive and dot hemorrhages. Total area of structural and hemorrhagic lesions made 77.2 ± 25.1 mm², index of destructive damage (IDD) was 4.6 ± 0.69 points. Introduction of nonselective COX inhibitor naproxen on the background of the action of acetic acid did not potentiate ulcerogenesis but also did not result in cytoprotective effect. Under these conditions area of SHD made 73.2 ± 11.1 mm², IDD was 4.0 ± 0.52 points. Ef-

fect of the compound ATB-346 on the background of colitis significantly improved the morphologic status of the mucous membrane: significant hyperaemia of the surface of CM remained but area of damage and IDD were significantly lower compared both to indices in colitis and effect of naproxen. As ATB-346 is the derivative of naproxen, differing from parental molecule by its ability to release H_2S , all effects, distinguishing ATB-346 and naproxen, are mediated by the impact of H_2S . Blockage of COX-2 by celecoxib resulted in the decrease of the area of destructive damage for 20% ($P \leq 0.01$) and IDD for 35% ($P \leq 0.01$). Thus, COX inhibition decreased the intensiveness of lipid peroxidation processes, what was accompanied by decrease of TBA-active products content and decrease of superoxide dismutase.

Under the conditions of colitis in colonic mucosa content of TBA-active products increased and SOD activity rose for 66% ($P \leq 0.01$). The administration of naproxen, ATB-346 and celecoxib on the background of the effect of acetic acid-induced colitis decreased activity of SOD for 36%, 35% and 56%, relevantly, compared to the indices in colitis. Thus, inhibition of COX resulted in the decrease of intensiveness of lipid peroxidation processes, what was accompanied by decrease of TBA-active products content and SOD activity.

Hence, administration of ATB-346 on the background of the experimental ulcerative colitis decreases area and severity of SHD in CM, at that cytoprotective effect of this drug was more significant than that of naproxen or celecoxib. ATB-346 due to release of H_2S exerted antiinflammatory and antioxidant effects in acetic acid-induced colitis, what was accompanied by decreased concentration of TBA-active products and SOD activity in CM.

Keywords: ulcerative colitis, cyclooxygenase, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, oxidative processes.

Рецензент – проф. Скрипник І.М.

Стаття надійшла 15.07.2015 р.