

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПРОЦЕСИ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ТА ТКАНИНІ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ

©І. С. Фоменко, Т. І. Бондарчук, О. Я. Склярів

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

РЕЗЮМЕ. У досліджах на щурах вивчено вплив нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) різного генезу на морфологічний стан слизової оболонки шлунка (СОШ), зміни показників ліпопероксидації та активність NO-синтази (NOS) у СОШ і тканині підшлункової залози (ПЗ). Показано, що введення неселективного інгібітора циклооксигенази (ЦОГ) напроксену потенціувало розвиток структурно-геморагічних уражень (СГУ) СОШ. Доведено переваги використання H_2S -зв'язаного НПЗП АТВ-346, оскільки він не зумовлював розвитку виразкових уражень шлунка. Проте показники ліпопероксидації та активність NOS як в СОШ, так і в тканині ПЗ за умов його впливу суттєво не відрізнялись від показників при дії напроксену та селективного інгібітора ЦОГ-2 целекоксибу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нестероїдні протизапальні препарати, нітрогену оксид, гідрогену сульфід, слизова оболонка шлунка, підшлункова залоза.

Вступ. НПЗП займають чільне місце у переліку чинників, вплив яких призводить до розвитку деструктивних змін органів травної системи [1, 4]. Найвираженішу ульцерогенну дію НПЗП чинять у СОШ, що можна пояснити інгібуванням синтезу простагландинів (ПГ), які утворюються за участі ЦОГ і реалізують численні фізіологічні ефекти у шлунку (регулюють продукцію гідрохлоридної кислоти, виділення слизу, кровотік, беруть активну участь у підтриманні цілісності СОШ) [7]. У ПЗ вони регулюють секрецію інсуліну, кровотік тощо [14]. Як у СОШ, так і в ПЗ експресується дві ізоформи ЦОГ: ЦОГ-1 – конститутивна та ЦОГ-2 – індукцйельна. Більшість існуючих НПЗП неселективно блокують синтез обох ізоформ ензиму і мають найвищий ступінь гастротоксичності. Існують НПЗП, що селективно інгібують ЦОГ-2, вони практично позбавлені ульцерогенного впливу на шлунок, проте можуть зумовлювати побічні ефекти з боку серцево-судинної системи [6]. У процесах ульцерогенезу, зумовлених введенням НПЗП, значну роль відіграє система нітрогену оксиду (NO). Останній синтезується з L-аргініну за участі NOS, яка існує у двох конститутивних ізоформах: ендотеліальна (eNOS) і нейрональна (nNOS) [8]. Під впливом чинників ульцерогенезу значно посилюється експресія індукцйельної NOS (iNOS), що призводить до різкого зростання синтезу NO, що спричиняє порушення функціонування низки біологічних процесів через утворення таких радикалів як нітроксил (NO^{\cdot}), пероксинітрит ($ONOO^{\cdot}$) тощо, які посилюють ушкодження клітини [9]. До «газових медіаторів» належить також гідрогену сульфід (H_2S), який у фізіологічній концентрації бере активну участь у механізмах захисту організму від факторів агресії, діючи як вазодилататор, нейромодулятор, антиоксидант [10, 15, 17]. Найкраще описаним із існуючих нині H_2S -зв'язаних НПЗП є АТВ-345 [4-тіокарбамоїл-феніл ефір 2-(6-мето-

ксинафтален-2-іл)-пропіонової кислоти], який має протизапальні властивості, притаманні напроксену, але не чинить побічних ефектів, властивих останньому [5, 16].

Мета дослідження – дослідити вплив НПЗП різного механізму дії (напроксену, H_2S -зв'язаного НПЗП АТВ-346 та целекоксибу) на показники ліпопероксидації та активність NOS у СОШ і ПЗ щурів.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження виконані на 32 білих щурах-самцях масою 180–240 г згідно з міжнародними умовами проведення експериментів на лабораторних тваринах. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію. У день проведення досліді тварин не годували, забезпечуючи безперешкодний доступ до води. Тварин було поділено на 4 групи (по 8 щурів у кожній): 1) інтактні; 2) тварини, яким вводили НПЗП напроксен (неселективний інгібітор ЦОГ); 3) щури, які отримували АТВ-346 (H_2S -зв'язаний НПЗП); 4) тварини, яким вводили целекоксиб (селективний ЦОГ-2 інгібітор). Усі досліджувані НПЗП вводили в дозі 10 мг/кг per os. Через 24 год тварин декапітували, виділяли шлунок і ПЗ. При транслюмінесцентному освітленні визначали площу та ступінь СГУ СОШ, після чого СОШ і ПЗ гомогенізували. У гомогенатах визначали активність NO-синтаз і вміст продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК) [2, 3]. Макроскопічно ураження СОШ оцінювали в балах за наявністю: 1) гіперемії (2 бали); 2) нальоту та дрібних крововиливів (4 бали); 3) нальоту та поверхневої ерозії (6 балів); 4) глибокої ерозії або кількох ерозій (8 балів); 5) виразки (10 балів); 6) виразки, ерозій, крововиливів (12 балів) [13]. Результати опрацьовано з використанням пакету Statistika 7,0 ANOVA з апостеріорним попарним порівнянням груп.

Результати та їх обговорення. Введення напроксену супроводжувалось розвитком СГУ у вигляді глибоких ерозій і виразок загальною пло-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

щею ($18 \pm 3,9$) мм^2 та індексом деструктивних ушкоджень ($5,8 \pm 0,5$) балів. Натомість АТВ-346 не зумовлював розвитку значних ушкоджень СОШ: площа СГУ при його введенні була у 8 разів нижчою, ніж при введенні напроксену. Селективне інгібування ЦОГ-2 целекоксибом також не призводило до суттєвого порушення цілісності СОШ, але поверхня шлунка всіх тварин цієї групи була вкрита шаром нерозчинного слизу, що може бути наслідком посилення злуцнення епітелію.

Рівень продуктів ТБК у СОШ підвищувався при введенні усіх досліджуваних НПЗП, вказуючи на активування процесів ліпопероксидації (табл. 1). Так, при неселективному інгібуванні ЦОГ напроксеном цей показник зростав на 27 % ($p < 0,01$). Аналогічні зміни спостерігали і в тканині ПЗ, де рівень продуктів ТБК статистично достовірно підвищився приблизно на 17 % в усіх групах тварин (табл. 2). Слід зазначити початково вищий рівень продуктів ТБК у ПЗ інтактних тварин.

Таблиця 1. Вміст ТБК-активних продуктів та активність NOS у СОШ ($M \pm m$)

Групи тварин	Інтактні	Напроксен	АТВ-346	Целекоксиб
Продукти ТБК мкмоль/ г	$209,8 \pm 10,2$	$266,6 \pm 13,1^*$	$271,2 \pm 11,4^*$	$267,3 \pm 13,2^*$
NOS (нмоль/хв г)	$0,57 \pm 0,23$	$0,93 \pm 0,22^*$	$0,92 \pm 0,21^*$	$0,93 \pm 0,11^*$
iNOS (нмоль/хв г)	$0,16 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,16^{**}$	$0,56 \pm 0,19^{**}$	$0,64 \pm 0,14^{**}$
eNOS (нмоль/хв г)	$0,41 \pm 0,15$	$0,41 \pm 0,17$	$0,36 \pm 0,17$	$0,29 \pm 0,18$

Примітка: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 2. Вміст ТБК-активних продуктів і активність NOS у ПЗ щурів ($M \pm m$)

Групи тварин	Інтактні	Напроксен	АТВ-346	Целекоксиб
Продукти ТБК мкмоль/ г	$403,0 \pm 18,0$	$473,8 \pm 6,3^{**}$	$473,2 \pm 10,3^{**}$	$471,8 \pm 3,0^{**}$
NOS (нмоль/хв г)	$0,64 \pm 0,19$	$0,55 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,20$	$0,56 \pm 0,11$
iNOS (нмоль/хв г)	$0,19 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,9^*$	$0,4 \pm 0,11^*$	$0,40 \pm 0,08^*$
eNOS (нмоль/хв г)	$0,48 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,06^{**}$	$0,25 \pm 0,13$	$0,16 \pm 0,11^*$

Примітка: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ порівняно з інтактними тваринами.

За фізіологічних умов як у СОШ, так і в ПЗ домінувала активність eNOS, тоді як за умов дії усіх НПЗП у СОШ спостерігалось зростання активності iNOS у 3,5–4 рази ($p < 0,01$), не зважаючи на різний вплив цих препаратів на морфологічний стан СОШ. У тканині ПЗ за умов впливу напроксену та целекоксибу спостерігалась тенденція до зниження загальної NOS і суттєво змінювався перерозподіл ізоформ цього ферменту. За умов дії усіх НПЗП активність iNOS зростала вдвічі ($p < 0,05$), а активність eNOS знижувалась приблизно в 3 рази ($p < 0,05$).

Оскільки застосування напроксену супроводжувалося посиленням процесів ліпопероксидації та активуванням iNOS у досліджуваних органах, то, на нашу думку, це підтверджує існування тісного взаємозв'язку між системами ЦОГ/ПГ і NOS/NO [11].

Нещодавніми дослідженнями показано, що введення НПЗП супроводжується інгібуванням синтезу H_2S , внаслідок чого його цитопротекторні властивості нівелюються, що може бути однією з причин розвитку гастропатій. Результати наших досліджень демонструють, що введення АТВ-346

не викликало розвитку СГУ в шлунку, що можна пояснити гастропротективною роллю H_2S . Водночас H_2S , що вивільняється з АТВ-346 при його введенні у дозі 10 мг/кг, не чинить антиоксидантної дії, оскільки рівень процесів ліпопероксидації як у СОШ, так і в тканині ПЗ перевищував норму і відповідав показникам при введенні напроксену. Нами було констатовано домінуючий вплив базової молекули напроксену при дії АТВ-346 на показники NOS системи. Імовірно, H_2S , вивільнений із АТВ-346, використовувався на забезпечення цитопротекторних ефектів, не пов'язаних із функціонуванням NOS системи, зокрема, інгібування адгезії лейкоцитів, посилення кровотоку тощо.

Коксиби з високою селективністю інгібують ЦОГ-2 і, як наслідок, фізіологічні ефекти ПГ, синтезованих ЦОГ-1, зберігаються. У наших дослідженнях показано, що введення целекоксибу не зумовлювало розвитку СГУ в шлунку, що, ймовірно, є наслідком топічних ефектів целекоксибу, не пов'язаних із інгібуванням ЦОГ: частковим руйнуванням фосфоліпідного бішару мембран епітеліоцитів із

порушенням їх проникності; впливом на дихальний ланцюг мітохондрій із подальшим роз'єднанням окисного фосфорилування тощо [12]. Це, своєю чергою, супроводжується стрімким зростанням кількості активних форм кисню, що у наших дослідженнях проявлялось посиленням процесів ліпопероксидації як у СОШ, так і в ПЗ.

Висновки. Неселективне інгібування ЦОГ напроксеном спричинювало формування структурно-геморагічних ушкоджень СОШ, активування процесів ліпопероксидації, а зростання активності iNOS як в СОШ, так і в ПЗ.

Одноразове введення H₂S-зв'язаного напроксену (сполуки АТВ-346) не спричинювало ульцерогенної дії в шлунку, проте й не чинило антиокси-

дантного ефекту, оскільки рівень продуктів ТБК, а також активність iNOS були на рівні таких при дії напроксену в обох досліджуваних тканинах. Селективне інгібування ЦОГ-2 целококсибом не викликало формування структурно-геморагічних ушкоджень поверхні СОШ, проте топічна дія цього НПЗП зумовлювала активування процесів ліпопероксидації та зміни активності NOS у СОШ і ПЗ.

Перспективи подальших досліджень. З метою з'ясування ролі H₂S у механізмах цитопротекції та ульцерогенезу в органах травної системи дослідити дозозалежні ефекти АТВ-346 і зміни біохімічних показників при його тривалому введенні, порівняно з іншими НПЗП.

ЛІТЕРАТУРА

1. Склярів А. Я. Нестероидные противовоспалительные средства, механизмы их действия, особенности использования / А. Я. Склярів И. С. Фоменко // Практична медицина. – 2007. – Т. XIV, №3. – С. 123–132.
2. Сумбаев В. В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В. В. Сумбаев, И. М. Ясинская // Совр. пробл. токсикологии. – 2000. – № 3. – С. 3–7.
3. 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.
4. Особенности применения нестероидных противовоспалительных средств у людей пожилого возраста / В. Б. Шатило, Л. А. Стаднюк, Е. О. Асанов, В. Ю. Приходько // Искусство Лечения. – 2010. – № 2. – С. 14–19.
5. A hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor markedly accelerates recovery from experimental spinal cord injury / M. Campolo, E. Esposito, A. Ahmad [et al.] // FASEB J. – 2013. – Vol. 27, 11. – P. 4489–4499.
6. Coruzzi G. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond / G. Coruzzi, N. Venturi, S. Spaggiari // Acta Biomed. – 2007. – Vol. 78. – P. 96–110.
7. Ham M. Gastroduodenal defense / M. Ham, J. D. Kaunitz // Current Opinion in Gastroenterology. – 2007. – Vol. 23. – P. 607–616.
8. Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract / A. Lanas // Arthritis Research & Therapy. – 2008. – Vol. 10, № 2. – P. 4.
9. H S-Releasing Aspirin Protects against Aspirin-Induced Gastric Injury via Reducing Oxidative Stress / L. Liu, J. Cui, Ch.-J. Song [et al.] // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 46301.
10. Lamarque D. Involvement of peroxyntirite in the lipid peroxidation induced by nitric oxide in rat gastric mucosa / D. Lamarque, B. J. Whittle // Eur. J. Pharmacol. – 1996. – Vol. 313, 1–2. – P. 5–7.
11. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors / V. Mollace, C. Muscoli, E. Masini [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2005. – Vol. 57. – P. 217–252.
12. Musumba C. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers / C. Musumba, D. M. Pritchard, M. Pirmohamed // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2009. – Vol. 30. – P. 517–531.
13. Nasadyuk C. Thymohexin exhibits cytoprotective effect in experimental gastric lesions in rats both through the inhibition of inducible nitric oxide synthase and reduction of oxidative mucosal damage / C. Nasadyuk, A. Sklyarov // Regulatory Peptides. – 2013. – № 180. – P. 50–57.
14. Cyclooxygenase-2, Not Microsomal Prostaglandin E Synthase-1, Is the Mechanism for Interleukin-1 β -induced Prostaglandin E₂ Production and Inhibition of Insulin Secretion in Pancreatic Islets / S. Parazzoli, J. S. Harmon, S. N. Vallerie [et al.] // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287 (38). – P. 32246–32253.
15. Predmore B. L. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine / B. L. Predmore, D. J. Lefer, G. Gojon // Antioxid. Redox. Signal. – 2012. – Vol. 17, № 1. – P. 119–140.
16. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (АТВ-346) / J. L. Wallace, G. Caliendo, V. Santagada, G. Cirino // British Journal of Pharmacology. – 2010. – Vol. 159. – P. 1236–1246.
17. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace, M. Dickey, W. McKnight, G. M. Martin // The FASEB Journal. – 2007. – Vol. 21. – P. 4070–4076.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

STUDY OF THE ACTION OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS UPON LIPOPEROXIDATION PROCESSES AND NO-SYNTASES ACTIVITY IN GASTRIC MUCOSA AND PANCREAS OF RATS

©I. S. Fomenko, T. I. Bondarchuk, O. Ya. Sklyarov

Lviv National Medical University by Danylo Halytsky

SUMMARY. In experiments on rats it was studied the influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) of different genesis on morphological status of gastric mucosa and changes of NO-synthase system parameters in gastric mucosa and pancreas. Administration of nonselective cyclooxygenase inhibitor naproxen caused the development of gastric mucosa damage. It was shown advantages of use of H₂S-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug ATB-346, because it displayed a cytoprotective effect and didn't cause the development of gastric lesions, however parameters of lipoperoxidation and NO-synthase system did not differ substantially from those in the group treated with naproxen or selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in both studied tissues.

KEY WORDS: nonsteroidal anti-inflammatory drugs nitric oxide, hydrogen sulfide, gastric mucosa, pancreas.

Отримано 03.11.2014