

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

**БУЛА НАЗАР СТЕПАНОВИЧ**

**УДК 612.387:546.221**

**РОЛЬ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ ЦИТОПРОТЕКЦІЇ  
СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ**

**14.03.03 – нормальна фізіологія**

**Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук**

**Вінниця – 2018**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор,  
**Заячківська Оксана Станіславівна,**  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького, завідувач кафедри  
нормальної фізіології

**Офіційні опоненти:** член-кор. НАН України,  
доктор медичних наук, професор,  
**Сагач Вадим Федорович,**  
Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,  
завідувач відділу фізіології кровообігу;

доктор медичних наук, професор  
**Шатило Валерій Броніславович,**  
Державна установа «Інститут геронтології  
ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»,  
заступник директора з науково-лікувальної роботи,  
головний науковий співробітник відділу  
клінічної фізіології і патології внутрішніх органів.

Захист відбудеться «15» січня 2019 р. о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.02 при Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова (21018, Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

Автореферат розісланий «12» грудня 2018 р.

**Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради**

**І.М. Кириченко**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Провідне місце у збереженні цілісності бар'єрної функції стравоходу належить простагландин-залежним і простагландин-незалежним механізмам, порушення яких спричиняє кислото-асоційовані, коморбідні або ятрогенні захворювання стравоходу (Fass R., 2014-2018; Savarino V., 2014-2017). Взаємодія системи циклу арахідонової кислоти з системами газових медіаторів: Гідрогену сульфідру ( $H_2S$ ), Нітрогену монооксиду та Карбону монооксиду є актуальним напрямом досліджень у різних фізіологічних процесах – регуляції судинного тонуру, роботи мітохондріальної пори, нейротрансмісії, стану системи гемостазу, моторики травної системи та ін. (Сагач В.Ф., 2014-2018; Заїчко Н.В., 2014-2018; Волощук Н.І., Таран Н.І., 2014; Kimura H., 2013-2018; Wallace J., 2014-2018; Szabo C., 2013-2018). Проте відсутні відомості щодо впливу  $H_2S$  на ранні прояви порушень бар'єрної функції, механізми адаптації та компенсації слизової оболонки стравоходу (СОС) за дії різних екстремальних чинників. Відкритим залишається питання пошуку безпечних засобів профілактики порушень проліферації в СОС, оскільки нещодавно встановлено, що застосування нестероїдних протизапальних препаратів (NSAIDs) запобігає трансформації метаплазії СОС у аденокарциному стравоходу. Така ситуація вимагає з'ясування впливу  $H_2S$  на механізми цитопротекції СОС в експериментальних моделях пошкодження стравоходу на тваринах. Розкриття ролі  $H_2S$  у цитопротекторних механізмах СОС дозволить обгрунтувати вплив новостворених гібридних сполук –  $H_2S$ -асоційованих NSAIDs ( $H_2S$ -NSAIDs) у порівнянні з класичними аналогами на бар'єрну функцію стравоходу і прояви запальних реакцій, що дозволить оцінити перспективність подальших доклінічних та клінічних досліджень щодо застосування  $H_2S$ -NSAIDs при езофагітах різної етіології.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (ЛНМУ), вона є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри нормальної фізіології: «Дослідження функціонально-метаболических резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних засобів корекції» (2011–2015 рр., 0111U000121 ІН 25.01.0001.11) і «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (2016–2021 рр., 0116U004510). У їх виконанні автору належать результати щодо структурно-функціональних особливостей стану бар'єрної і захисної функцій стравоходу за індукції пошкодження різної етіології, що слугувало підґрунтям дисертаційної роботи. Тема дисертації затверджена Вченою радою медичного факультету № 2 ЛНМУ (№ 3, 17.03.2014).

**Мета дослідження.** Встановлення ролі системи  $H_2S$  у забезпеченні бар'єрної функції та адаптаційно-компенсаторних механізмів СОС за індукції пошкодження різної етіології.

### **Завдання дослідження:**

1. Дослідити значення  $H_2S$  у забезпеченні цитопротекторних та адаптаційно-

компенсаторних механізмів за умов порушення його епітеліального бар'єру стравоходу після впливу тетрахлорметану ( $\text{CCl}_4$ ), гіперглікемії та модифікації синтезу ейкозаноїдів.

2. З'ясувати вплив модифікації стану систем  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\gamma$ -ліази,  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\beta$ -синтази (за допомогою інгібіторів синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  – пропаргілгліцину, карбоксиметил-гідроксиламін геміхлориду та донора  $\text{H}_2\text{S}$  – натрій гідрогенсульфіду), модифікації біосинтезу ейкозаноїдів і застосування  $\text{H}_2\text{S}$ -асоційованого напроксену на бар'єрну функцію стравоходу і прояви протизапальних реакцій.

3. Визначити роль  $\text{H}_2\text{S}$  у фізіологічних захисних та адаптаційно-компенсаторних механізмах слизової оболонки стравоходу за умов моделювання стрес-індукованих пошкоджень і за гальмування активності системи  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\gamma$ -ліази.

4. Проаналізувати зміни показників прозапальних реакцій за діапазоном вмісту інтерлейкінів (IL) IL-6, IL-10, IL-17 і гранулярного хемотактильного протеїну-2 (GCP-2) у сироватці крові та ступенем руйнування епітеліального бар'єра стравоходу під час модифікації біосинтезу  $\text{H}_2\text{S}$ .

5. Оцінити зв'язок між чутливістю слизової оболонки стравоходу до впливу ульцерогенних чинників і прозапальними реакціями після введення класичного й гібридного  $\text{H}_2\text{S}$ -асоційованого напроксену і  $\text{H}_2\text{S}$ -асоційованого аспірину в різні терміни застосування.

*Об'єкт дослідження* – фізіологічні механізми захисних та адаптаційно-компенсаторних реакцій слизової оболонки стравоходу щурів за умов ульцерогенних пошкоджень зміною каталітичної активності біосинтезу  $\text{H}_2\text{S}$ .

*Предмет дослідження* – структурно-функціональні особливості стану бар'єрної і захисної функцій стравоходу; протизапальна активність цитокін-чутливих сигнальних шляхів за умов норми, модифікування біосинтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , ейкозаноїдів і застосування  $\text{H}_2\text{S}$ -NSAIDs.

*Методи дослідження*: фізіологічні – моделювання цитолітичних пошкоджень СОС співвідносних з ознаками неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії; біохімічні – блокування активності цистатіонін- $\gamma$ -ліази (CSE) і цистатіонін- $\beta$ -синтази (CBS), застосовуванням сполук донорів сірководню:  $\text{NaHS}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ -напроксену,  $\text{H}_2\text{S}$ -аспірину; морфологічні – макроскопічне та гістологічні дослідження СОС; імунологічні методи та методи варіаційної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було підтверджено, що застосування тетрахлорметану, моделювання зміни ейкозаноїдів і активності систем  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\gamma$ -ліази та  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\beta$ -синтази призводять до руйнування бар'єрної та захисної функцій СОС. Доведено цитопротекторну роль  $\text{H}_2\text{S}$  та можливість моделювання неерозивного езофагіту за рахунок гальмування систем  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\gamma$ -ліази,  $\text{H}_2\text{S}$ /цистатіонін- $\beta$ -синтази, що спричиняє руйнування природних захисних властивостей СОС і порушення адаптаційно-компенсаторних механізмів через індукцію деструктивних змін епітеліального бар'єра, ендотеліальної дисфункції та зміни цитокінової регуляції GCP-2, IL-6, IL-10 і IL-17. Уперше підтверджено значення  $\text{H}_2\text{S}$  в адаптаційно-компенсаторних механізмах бар'єрної та захисної функцій стравоходу, секреції прозапального

інтерлейкіну IL-6 та ангіогенного білка GCP-2, встановлено спряжені з активністю систем  $H_2S/CSE$  та  $H_2S/CBS$  їх зміни. Експериментально підтверджено, що застосування донора  $H_2S$  NaHS сприяє цитопротекції СОС, асоційованій зі змінами вмісту GCP-2 і IL-6, IL-10 і IL-18, які опосередковують про- та протизапальні зміни в організмі. Вперше встановлено, що застосування  $H_2S$ -NSAIDs знижує чутливість СОС до цитоагресивного впливу ейкозаноїдів. Отримані результати слугують підґрунтям для подальшого вивчення  $H_2S$ -NSAIDs, як засобів, що зберігають терапевтичну протизапальну активність і володіють езофагопротекторними властивостями.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати дослідження допомогли теоретично та методологічно обґрунтувати новий спосіб моделювання неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії шляхом порушення ендогенного біосинтезу  $H_2S$ , що можна рекомендувати для практики доклінічних досліджень лікарських засобів. Результати досліджень поглиблюють розуміння фізіологічної основи клітинно-молекулярних механізмів захисних функцій СОС, індукованих  $H_2S$ , що може сприяти розробці нових способів профілактики й лікування неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії. Розкрито механізми езофагопротекторного впливу донора сірководню NaHS,  $H_2S$ -напроксену і  $H_2S$ -аспірину. Дослідження особливостей цитопротекторних і прозапальних реакцій за умов поєднання стресу та модифікації вмісту  $H_2S$  дало змогу виявити чутливість СОС до впливу класичних і гібридних  $H_2S$ -NSAID і підтвердити доцільність продовження їх вивчення, як безпечних лікувально-профілактичних засобів. Результати дослідження впроваджені в навчальний процес кафедр фізіології ЛНМУ, Івано-Франківського національного медичного університету, Дніпропетровської медичної академії, Буковинського державного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачовського, Харківського національного медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно проведено інформаційний пошук, аналіз наукової літератури за темою роботи, експериментальні дослідження, забір матеріалу, обґрунтування отриманих результатів і статистичне опрацювання даних. Ідея дослідження, методологія роботи, обговорення результатів, формулювання висновків здійснені за участі наукового керівника. У публікаціях, що опубліковані в співавторстві, автору належать розробки стосовно змін бар'єрної функції стравоходу за зміни активності систем  $H_2S$ /цистатіонін- $\gamma$ -ліази (CSE) та  $H_2S$ /цистатіонін- $\beta$ -синтази (CBS), дії NaHS, гібридних  $H_2S$ -напроксену та  $H_2S$ -аспірину та в поєднанні з індукцією стресу. Висловлюємо подяку за консультативну допомогу у проведенні гістологічних досліджень доценту ЛНМУ, к.м.н. О.М. Гаврилюк, імунологічних досліджень – ст.н.сп. ЛНМУ, к.м.н. О.І. Грушці, що знайшло відображення в спільних публікаціях. Експериментальні дослідження виконані спільно зі співробітниками кафедри нормальної фізіології ЛНМУ, які є співавторами опублікованих праць, конфлікту інтересів немає. Частина результатів, що стосуються змін бар'єрної функції стравоходу в щурів за умов гіперглікемії отримано спільно з Н.Р. Грицевич, було використано в його кандидатській дисертації (Грицевич Н.Р. «Вивчення механізмів впливу L-триптофану та

мелатоніну на слизову оболонку стравоходу за умов експериментальної гіперглікемії» [Текст] : дис. ... к-та мед. наук : 14.03.03 – нормальна фізіологія / Грицевич Назар Романович; Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. – Львів, 2014. – 154 арк. :: 5 табл.). Препарати для модифікації вмісту  $H_2S$ ,  $H_2S$ -NSAIDs люб'язно надані J.L.Wallace.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені на: XIV з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства та Конгресі Європейського південно-східного медичного форуму, Одеса (2015); науково-практичній конференції з міжнародною участю “Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування”, Київ (2015); Bridges in Life Sciences 9<sup>th</sup> Annual Scientific conferences, RECOOP, Split (2014); 18<sup>th</sup> International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection /Organoprotection, Budapest (2014); Summer School on Stress. From Hans Selye's original concept to recent advances, Grenoble (2015); 15<sup>th</sup> International Conference of Ulcer Research, Ottawa (2015); RECOOP 6<sup>th</sup> TriNet Meeting, Prague, RECOOP (2015);. Bridges in Life Sciences 11<sup>th</sup> Annual Scientific Conference RECOOP, Prague, (2016); Cedars-Sinai Medical Center & RECOOP. Bridges in Life Sciences Annual Conference, Budapest (2017); 2<sup>nd</sup> Regional Congress of Physiological Societies and 4<sup>th</sup> Congress of Croatian Physiological Society, Dubrovnik (2017); 8<sup>th</sup> TriNet Meeting, RECOOP, Zagreb (2017).

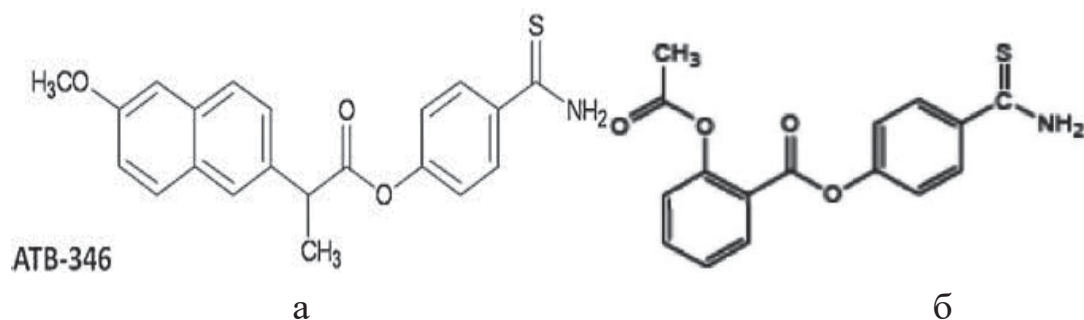
**Публікації.** Результати дисертації опубліковані у 21 друкованій роботі, з них 8 статей: 5 – у вітчизняних журналах, 3 – у закордонних журналах, що індексуються Scopus (PloS One, Inflammopharmacology, Folia Medica Cracoviensia) та 13 – тези.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 165 сторінках (з яких 105 сторінок основного тексту) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел, що містить 296 найменувань (з них 263 – латиницею), та 2 додатків. Дисертація ілюстрована: 39 рисунками, 5 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проводили на білих нелінійних лабораторних щурах-самцях (n=139), масою 170-220 г, згідно з Законом України, Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях та дозволу комісії з біоетики ЛНМУ (протокол №2, 24.02.2014). Тварин утримували в стандартних стаціонарних умовах віварію. У серії експериментів для моделювання висококалорійного харчування використовували раціон з високим вмістом вуглеводів (HSD, від англ.: high sugar diet), коли щурі мали вільний доступ до 30% розчину фруктози (Козар В.В., 2008). У якості контрольного препарату (плацебо) застосовували стерильний 0,9% розчин NaCl. Для вилучення  $H_2S$ /CSE системи застосовували пропаргілгліцин (PAG), CBS/ $H_2S$  – карбоксиметил-гідроксиамінгеміхлорид (СНН) і для збільшення ендогенного синтезу  $H_2S$  – натрій гідрогенсульфід (NaHS). Для з'ясування ролі  $H_2S$  у механізмах цитопротекції вводили напроксен («Авант», Україна) та аспірин (ASA, «Борщагівський хіміко-

фармацевтичний завод», Україна) та сполуки H<sub>2</sub>S-напроксену (рис. 1.а) і H<sub>2</sub>S-аспірину (рис. 1.б) («Antibe», Канада) в умовах разового або тривалого введення та у поєднанні з індукцією гострого водно-іммобілізаційного стресу (ВІС) за Takagi K., et. al., 1968.



**Рис.1.** а. H<sub>2</sub>S-напроксен (АТВ-346); б. H<sub>2</sub>S-аспірин (АТВ-340).

Для виведення щурів з експерименту застосовували внутрішньоочеревинне (в/о) введення тіопенталу натрію, з розрахунку 60 мг/кг<sup>-1</sup> маси тіла. Під час аутопсії забирали кров для досліджень і виготовляли препарати стравоходу.

Схеми експериментів. У 1-му етапі для дослідження бар'єрної функції стравоходу було дві серії досліджень. У 1-й серії пошкодження СОС здійснювали після впливу ССl<sub>4</sub>: 1 група – контроль з плацебо, в/о; 2, 3, 4 групи – ССl<sub>4</sub> в дозі 0,3 мл/200 г двічі/добу *per os* з їжею і введення в/о по групам: 2) плацебо, 3) напроксен – 30 мг/кг, 4) H<sub>2</sub>S-напроксен – 43,5 мг/кг. У 2-й серії щурам пошкодження СОС здійснювали після 28-денного НSD і модифікування ендogenous синтезу H<sub>2</sub>S. Тварин групували: 1) контроль з плацебо, в/о; 2) РАG – 25 мг/кг, в/о; 3) СНН – 3 ммоль/кг, в/о, 4) NaHS – 100 мкмоль/кг, в/о.

У 2-му етапі досліджували бар'єрну функцію СОС за умов модифікування ендogenous синтезу H<sub>2</sub>S, ейкозаноїдів та в поєднанні з індукцією ВІС. Тварин групували і вводили в/о: 1) контроль, плацебо; 2) РАG – 25 мг/кг; 3) СНН – 3 ммоль/кг, 4) NaHS – 100 мкмоль/кг; 5) плацебо та індукували ВІС; 6) NaHS – 100 мкмоль/кг та індукували ВІС. Щурі 7, 8, 9, 10 і 11 групи отримували напроксен – 30 мг/кг, *per os*, 9 днів; і вводили в/о 8) РАG – 25 мг/кг; 9) NaHS – 100 мкмоль/кг; 10) РАG – 25 мг/кг та ВІС; 11) NaHS – 100 мкмоль/кг та ВІС; 12) H<sub>2</sub>S-напроксен – 14,5 мг/кг, *per os* 9 днів та ВІС.

У 3-му етапі з метою з'ясування впливу H<sub>2</sub>S на бар'єрну функцію та адаптаційно-компенсаторні властивості СОС використовували аспірин і H<sub>2</sub>S-аспірин та індукцію ВІС. Тварин групували та вводили *per os*: 1) плацебо (контроль); 2) аспірин – 10 мг/кг/добу; 3) аспірин – 10 мг/кг/добу, 9 днів; 4) аспірин – 10 мг/кг/добу та ВІС; 5) H<sub>2</sub>S-аспірин – 17,5 мг/кг/добу; 6) аспірин – 10 мг/кг/добу 9 діб та ВІС; 7) H<sub>2</sub>S-аспірин – 17,5 мг/кг/добу, 9 діб та ВІС.

Дози і спосіб введення РАG, СНН, NaHS, АТВ-346, АТВ-340 за Wallace J.L., et al., 2012-2017.

Макроскопічні дослідження СОС здійснювали за критеріями класифікації хвороб стравоходу (Vevey, 2011). Гістологічні дослідження СОС проводили на парафінових зрізах, забарвлених гематоксиліном-еозином. Для характеристики бар'єрної функції стравоходу використовували гістологічний індекс ураження

(ГІУ) з урахуванням таких кількісно-якісних критеріїв змін СОС: епітеліальної пластинки за ступенем альтерації: 0 – змін немає; 1 – розшарування рогового шару; 2 – вогнищева базофілія мас кератину; 3 – десквамація рогових мас, вакуолізація клітин базального шару, везикулярні ядра; 4 – ерозія; підепітеліальних структур: 0 – змін немає; 1 – дифузний набряк підслизової основи; 3 – виражений набряк та дезорганізація підслизової основи; 4 – периваскулярні або субепітеліальні інфільтрати, периваскулярні крововиливи; лейкоцитарної інфільтрації епітеліальної пластинки: 0 – змін немає; 1 – помірна; 2 – середня; 3 – виражена; 4 – лейкоцитарні інфільтрати; м'язової оболонки за проявами некрозу: 0 – змін немає; 1 – каріорексис, каріопікноз; 2 – фокальний некроз; 3 – множинні вогнища некрозу; 4 – генералізований некроз.

Вміст ІL-6, GCP-2, а також ІL-10 та ІL-17 у сироватці крові визначали за допомогою реагентів для імуноферментного визначення («Multi-Analyte ELISArray® Kit, Cedarlane Labs», Канада та «Вектор-бест», Росія, відповідно).

Статистичну обробку результатів, розрахунки похідних і побудову діаграм здійснювали за допомогою ліцензійного пакету програмного забезпечення STATISTICA for Windows 5.0 та електронних таблиць Excel (MS Office).

**Результати дослідження та їх аналіз.** Отримані відомості про гістологічні зміни епітеліального бар'єра СОС у щурів, індукованих  $CCl_4$  та після введення напроксену та  $H_2S$ -напроксену, засвідчують значне потовщення нерогового шару у тварин, що зазнали впливу  $CCl_4$ , товщина якого була більшою у 2 рази vs контролю. Ознакою впливу  $CCl_4$  для строми СОС було судинне повнокрів'я, місцями з вираженим лейкоцитозом. За поєднання  $CCl_4$  та змін активності циклооксигенази (COX) в епітеліальній пластинці у верхній та середній третині стравоходу не виявлено. Проте, у підслизовій основі спостерігалися виражений набряк, повнокрів'я судин мікроциркуляторного русла, що відповідає гістологічним ознакам неерозивного езофагіту. У нижній третині СОС серед десквамованих епітеліоцитів зустрічалися клітини з незмінними ядрами. Потовщення епітеліального шару сягало 5-6-го рядів епітеліоцитів. Ознаки поляризації епітелію відсутні, клітини з гіперхромними ядрами та нечіткою цитоплазмою були розміщені по всій товщі епітеліального шару. У м'язовій пластинці виявлено виражений субепітеліальний поліморфноклітинний інфільтрат: множинні мононуклерні клітини та поліморфноядерні лейкоцити. Також встановлено виражені поверхневі базофільні нашарування у формі дифузних дрібногранулярних або великих вогнищ, які виступали над поверхнею епітеліоцитів. Застосування АТВ-346 та  $CCl_4$  показало відсутність нашарувань у незроговілому шарі, зміни підслизової основи були помірними, підепітеліальний набряк та зміни епітеліальної пластинки не виявлені. Таким чином, підтверджено можливість індукції неерозивного езофагіту цитотоксичним впливом  $CCl_4$  та модифікацією активності COX. Натомість дія  $H_2S$ , що є компонентом АТВ-346, виявляла цитопротекторний вплив на СОС, нівелюючи вплив тетрахлорметану.

Гіперглікемія сприяє надлишковому утворенню метилглюксалу, який має виразну пошкоджувальну цитоагресивну дію (Mastrocola R., 2013). Досліди за умов HSD та гальмування системи  $H_2S$ /CSE системи показали, що руйнування СОС відбулося у більшій мірі, ніж за  $H_2S$ /CBS системи, і супроводжувалося



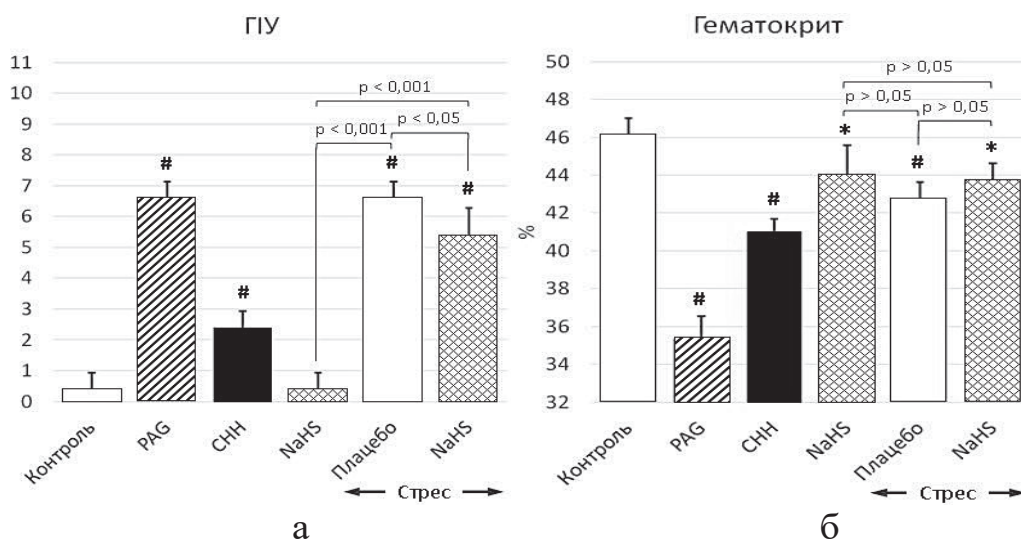
десквамацією епітелію, появами геморагій і мікротромбів у підслизовій основі, відшаруванням епітеліальної пластинки від підслизової основи, лейкоцитарною інфільтрацією. Екзогенне введення NaHS зменшувало сприйнятливості СОС до цитолітичного впливу HSD, що виявлялось зменшення міжклітинних проміжків, лейкоцитарної епітеліальної інфільтрації, утворення мікротромбів.

Ознаки пошкодження СОС за ГІУ у щурів з введенням PAG на тлі гіперглікемії у 2 рази були збільшеними за показників тварин з гіперглікемією та нормальним синтезом  $H_2S$ . За використання NaHS зміни СОС за ГІУ були співвідносні з показними тварин груп контролю. Дослідження цитокинового регулювання за вмістом протизапального IL-10 та прозапального IL-17 у сироватці крові показало, що вміст IL-10 у щурів з HSD становить  $(24,92 \pm 1,83)$  пг/мл, а для IL-17 –  $(7,123 \pm 0,602)$  пг/мл. Під час розвитку неерозивного езофагіту у щурів виявляли вірогідне збільшення синтезу прозапального IL-17 у 2,5 рази за умов застосування PAG ( $p < 0,05$ ) та 3 рази за використання СНН ( $p < 0,05$ ) vs до контролю. Під впливом NaHS вірогідно був меншим вміст IL-17 ( $p < 0,05$ ), однак залишався збільшеним у 2 рази vs до контролю ( $p < 0,05$ ). Вміст протизапального IL-10 на тлі експериментального езофагіту зменшувався під час застосування PAG на  $(15,23 \pm 0,68)$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), тоді як за введення СНН – зменшувався на 50% ( $p < 0,05$ ). У щурів, яким ввели NaHS, вміст IL-10 наближався до показників тварин контрольної групи.

Таким чином, інтенсифікація запалення після модифікації біосинтезу сірководню вилученням  $H_2S/CSE$  і  $H_2S/CBS$  систем  $H_2S$  на тлі HSD у щурів асоціювалася з підвищенням вмісту IL-17 та зменшенням вмісту IL-10, що обмежує розвиток імунних реакцій. Натомість, за умов застосування NaHS вміст IL-17 та IL-10 не зазнали змін, що вступає у певне протиріччя з очікуваним. Такий ефект можна пояснити тим, що під впливом гіперглікемії виникав достатньо високий рівень хронічного запалення, яке одноразовим введенням донора синтезу сірководню NaHS не можливо зменшити.

Для цього, щоб з'ясувати роль  $H_2S$  у адаптаційно-компенсаторних властивостях СОС, ми вивчали зміни у стравоході індуцією ВІС після одноразового введення PAG, СНН, NaHS і порівнювали з даними з плацебо. Гістологічне дослідження зрізів нижньої третини стравоходу показало, що за умов індуції стрес-асоційованого езофагіту СОС характеризувалася деструкцією епітеліального бар'єра, ерозивно-геморічними пошкодженнями, десквамацією епітелію у просвіт, роз'єднанням епітеліальних клітин, відшаруванням епітеліальної пластинки від базальної мембрани, інфільтрацією імунними клітинами власної пластинки, мікротромбами та руйнуванням м'язової пластинки. Введення PAG сприяло виникненню пошкоджень неерозивно-геморагічного характеру, що за гістоморфологічними характеристиками наближалися до ознак стрес-індукованих пошкоджень СОС. За ранжуванням ГІУ PAG-індуковані пошкодження СОС понад 2 рази  $6,600 \pm 0,547$  перевищували показники тварин з введенням СНН ( $2,400 \pm 0,547$ ), що підтверджувало потужне вилучення вазотропного компонента езофагопротекції. Індуція стресу викликала аналогічні зміни у СОС, як у разі введення PAG ( $p < 0,05$ ). Попереднє введення NaHS полегшувало гістопатологічні ознаки стрес-асоційованого езофагіту, що

характеризувалось зменшенням ГІУ (рис. 2.а) до показників тварин, які не отримували корекції ( $p < 0,05$ ). За ГІУ ознаки експериментального стрес-асоційованого езофагіту були співвідносними з ознаками впливу РАГ ( $p < 0,05$ ).



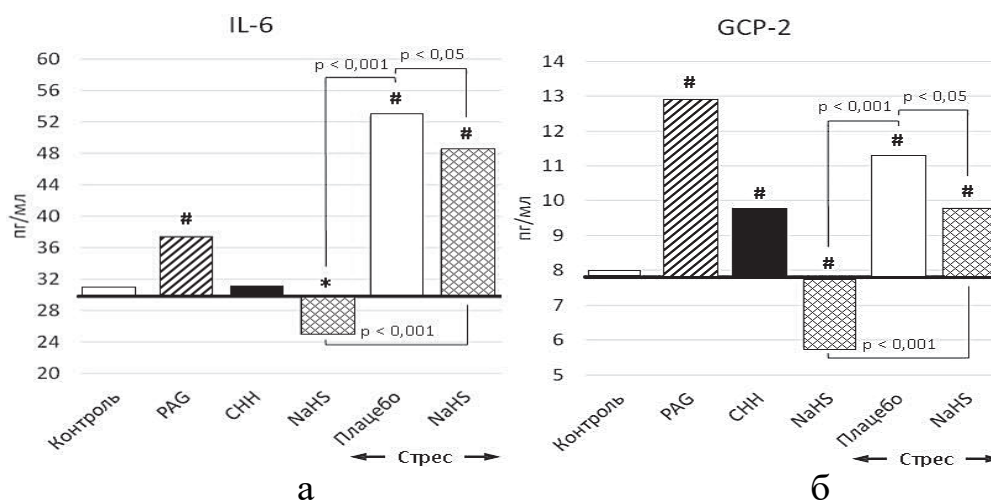
**Рис. 2.** Гістологічний індекс ураження (а) і зміни гематокриту (б) за застосування (в/о) РАГ (25 мг/кг), СНН (3 ммоль/кг), NaHS (100 мкмоль/кг) та індукції стресу; \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$  vs контролю.

Відомо, що ерозивно-геморагічні та виразкові пошкодження бар'єрної функції органів травлення можуть індукувати кровотечі (Гончарук Л.М., 2016; Blackler R.W., 2014), які важко діагностувати у тварин під час експерименту макроскопічним обстеженням органів. З огляду на такі обставини, ми вивчали зміни гематокриту. Найсуттєвіші зміни гематокриту (рис. 2.б) виникали після введення РАГ, коли виявляли його зменшення на 10-11% ( $p < 0,05$ ) vs показників контролю ( $46,20 \pm 0,84$ ).

Під час індукції стресу та застосування NaHS виявлено збільшення гематокриту порівняно з показниками щурів, які отримували плацебо.

Порушення синтезу  $H_2S$  може модулювати численні сигнальні шляхи, тому нами було обрано для дослідження: IL-6 – первинний прозапальний цитокін, що активує функції тканини навколо себе; GCP-2 – вторинний запальний цитокін, що має властивості хемокіну спеціального призначення (аналог IL-8) і спрямовує до вогнища запалення лімфоцити та лейкоцити з крові (Singh U.P., 2016). Середнє значення вмісту IL-6 у щурів контрольної групи становило ( $29,66 \pm 0,58$ ) пг/мл, що прийнято нами за “умовну норму”. Під час блокування активності  $H_2S/CSE$  системи збільшувався вміст IL-6 до ( $37,50 \pm 2,27$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ), тоді як  $H_2S/CSE$  – майже не відрізнявся ( $31,06 \pm 1,26$ ) пг/мл vs до контролю (рис. 3.а). Виявлено, що введення NaHS зменшувало вміст IL-6 vs до контролю ( $p < 0,05$ ). За індукції стресу вміст IL-6 збільшувався на 80% від контрольного значення, тоді як введення NaHS зменшувало вміст IL-6 на 28%. Вміст GCP-2 за введення РАГ збільшувався в 1,8 рази, тоді як СНН - на 30% порівняно з показниками контролю ( $7,746 \pm 0,229$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ), що прийняли за “умовну норму”. Вміст GCP-2 (рис. 3.б) за умов застосування NaHS зменшувався ( $5,778 \pm 0,582$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ), а у щурів з ВІС і

введення такого засобу – зменшувався до  $(9,796 \pm 0,527)$  пг/мл (на 25% менше vs до контролю,  $p < 0,05$ ).

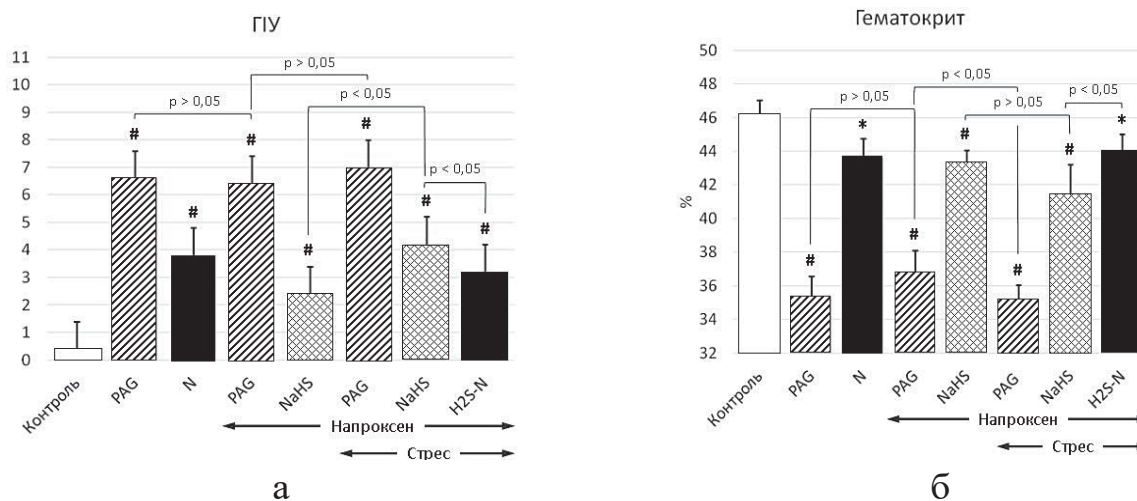


**Рис. 3.** Вплив модифікації вмісту сірководню за застосування (в/о) PAG (25 мг/кг), СНН (3 ммоль/кг), NaHS (100 мкмоль/кг) та індукції стресу на вміст ІЛ-6 (а) та GCP-2 (б) (пг/мл); \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$  vs контролю.

Отже, застосування NaHS чинило захисний вплив у протидії стрес-індукованим пошкодженням завдяки зменшенню ІЛ-6 і GCP-2 і проульцерогенних змін вазотропного генезу, що мають визначальну роль у бар'єрній і захисній функціях СОС.

Для підтвердження впливу  $H_2S$  на бар'єрну функцію СОС за умов модифікації біосинтезу ейкозаноїдів використовували класичний напроксен і гібридний  $H_2S$ -напроксен. Під час обстеження СОС у щурів, яким вводили напроксен протягом 9 днів, виявлено макроскопічні ознаки змін, співвідносні з М ступенем пошкоджень стравоходу порівняно до даних контрольної групи з ступенем N. Гістологічним дослідженням виявлено ознаки напроксенового езофагіту: альтерація поверхневого шару, розпушення епітелію і злущення його у просвіт стравоходу. За умов вилучення активності  $H_2S$ /CSE системи під час макроскопічного обстеження на СОС виявлено пошкодження типу А – вогнищеві крововиливи на тлі повнокрів'я. Гістологічним дослідженням СОС встановлено виразні цитолітичний і вазотропний ефекти PAG, що характеризувались злущенням поверхневого епітеліального шару, утворенням підепітеліального набряку, потовщенням базальної мембрани, дезорганізацією підслизової основи, появою поодиноких мікротромбів і периваскулярного діapedезу у субепітеліальних структурах. У групі тварин з гальмуванням активності системи  $H_2S$ /CSE зміни СОС у переході в кардіальну частину характеризувались геморагіями та дезорганізацією підслизової основи, включно з м'язовою пластинкою та набряком власної пластинки стравоходу. Ранжування пошкоджень СОС (рис. 4.а) показало, що вилучення синтезу  $H_2S$  викликало зміни СОС, які відповідали ГІУ  $6,600 \pm 0,547$ . Поєднання напроксенового-езофагіту з нестачею  $H_2S$  призвело до збільшення ГІУ у 2 рази порівняно з показниками тварин з езофагітом і природною біодоступністю  $H_2S$  ( $p < 0,01$ ). Введення донора  $H_2S$  щурам з напроксеновим-езофагітом суттєво

нівелювало ознаки пошкоджень, які за ГІУ були у 2 рази меншими, ніж у тварин без корекції ( $p < 0,01$ ) і майже в 3 рази меншими, ніж у щурів, яким застосовували PAG ( $p < 0,01$ ).

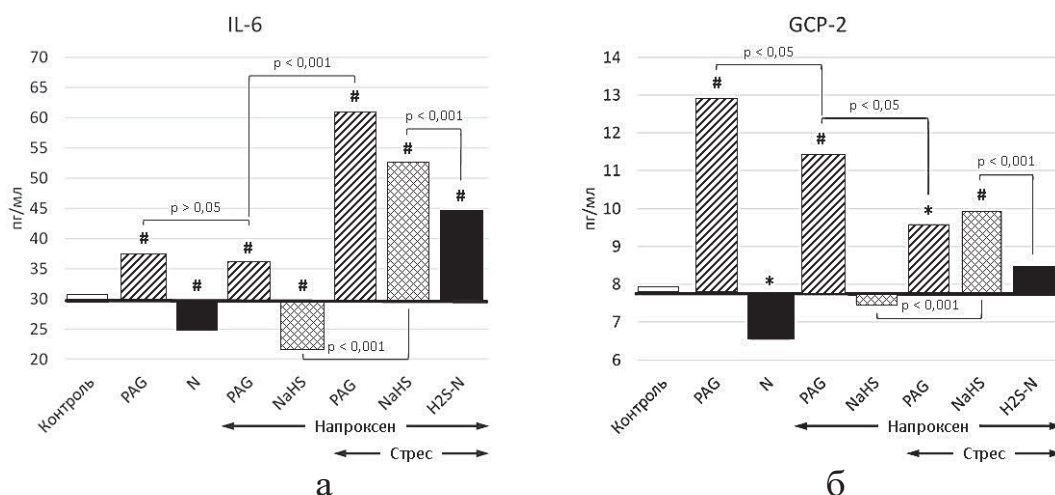


**Рис. 4.** Зміни гістологічного індексу ураження (а) і гематокриту (б) за напроксенового езофагіту (30 мг/кг/день, 9 днів, *per os*) і після (в/о) PAG (25 мг/кг), NaHS (100 мкмоль/кг), застосування H<sub>2</sub>S-N (14,5 мг/кг, 9 днів, *per os*) та індукції стресу; \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$  vs контролю.

Індукція стресу на тлі блокування H<sub>2</sub>S/CSE системи призвела до змін, які характеризувалися втратою кератину, від'єднанням епітеліальної пластинки від підепітеліальних структур, десквамацією епітелію у просвіт стравоходу, утворенням підепітеліального набряку, інтенсивною внутрішньоепітеліальною інфільтрацією та геморагіями, що відповідали значному збільшенню ГІУ ( $7,000 \pm 0,707$ ,  $p < 0,01$ ). Тоді як, у тварин зі стресом і введенням донора H<sub>2</sub>S NaHS генералізовані дефекти цілісності епітеліальної пластинки, мікротромби та розлади у субепітеліальних структурах відсутні, міжепітеліальний набряк був незначним, що може вказувати на ефективну езофагопротекторну дію H<sub>2</sub>S під час індукції ВІС. Це також підтверджено зменшенням гематокриту в межах 10% ( $p < 0,01$ ), тоді як за вилучення активності H<sub>2</sub>S/CSE системи – понад 20% vs до контролю (рис. 5.б). Встановлено, що застосування H<sub>2</sub>S-напроксену призвело до зменшення сприйнятливості до стресу та ознак альтерації й запалення у СОС. Структури строми збережені у більшій мірі, також відсутня дезорганізація м'язового шару у ділянці переходу стравоходу у кардіальну частину шлунку.

Вивчення спрямованості протизапальних реакцій за вмістом IL-6 і GCP-2 (рис. 5.а) за умов моделювання NSAIDs-асоційованої езофагопатії та зміни біосинтезу сірководню показало, що введення PAG призвело до збільшення вмісту IL-6 у щурів без ( $37,50 \pm 2,27$ ) пг/мл та з медикаментозним езофагітом ( $35,88 \pm 0,83$ ) пг/мл і поєднання цитотоксичного впливу напроксену і ВІС ( $60,87 \pm 1,11$ ) пг/мл vs до контролю ( $p < 0,01$ ). Такі прояви прозапальних реакцій можуть свідчити про активну участь H<sub>2</sub>S/CSE-системи у цитопротекції та природних захисних реакціях, що виявляються в активуванні проявів доімунного запалення, а саме експресії адгезивних молекул, міграції лейкоцитів у тканини. За умов введення NaHS у

щурів з напроксеновим езофагітом виявлено менший вміст ІЛ-6 до 30% vs до контролю, а за індукції ВІС – до  $52,31 \pm 1,09$  пг/мл ( $p < 0,01$ ). Застосований  $H_2S$ -напроксен зменшував вміст ІЛ-6 у 2 рази порівняно з впливом РАГ і на 30% порівняно з впливом NaHS ( $p < 0,01$ ), демонструючи кращу езофагопротекторну дію, ніж класичний напроксен.

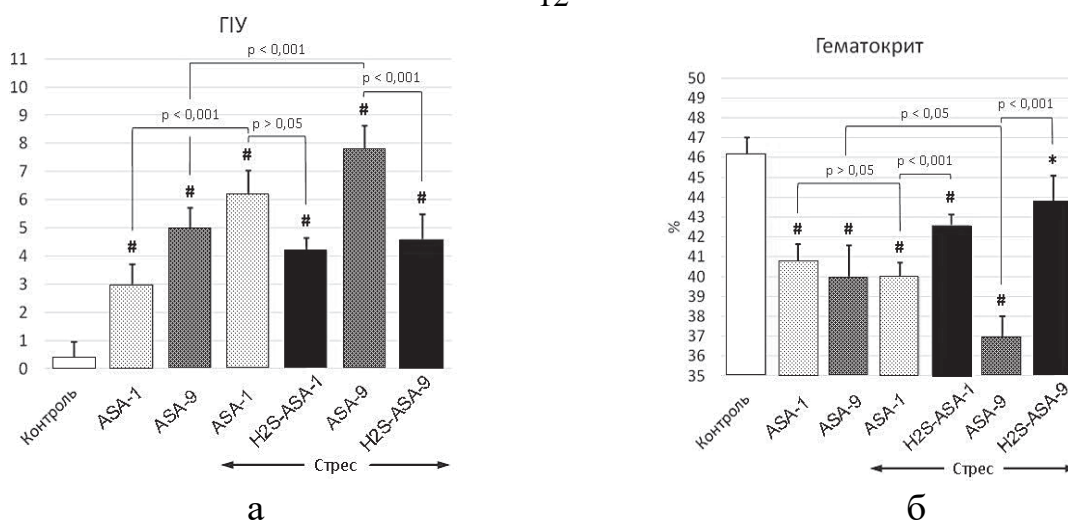


**Рис. 5.** Вміст ІЛ-6 (а) і GCP-2 (б) (пг/мл) у щурів за напроксенового езофагіту (30 мг/кг/день, 9 днів, *per os*) і після (в/о) РАГ (25 мг/кг), NaHS (100 мкмоль/кг), застосування  $H_2S$ -N (14,5 мг/кг, 9 днів, *per os*) та індукції стресу; \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$  vs контролю.

Динаміка змін вмісту GCP-2 (рис. 5.б) засвідчила, що за блокування активності  $H_2S$ /CSE спричиняло вірогідне збільшення вмісту до  $12,92 \pm 1,01$  пг/мл, тоді як у тварин з експериментальним напроксеновим езофагітом – у 1,5 разу ( $p < 0,01$ ) vs до контролю.

Вірогідне зниження вмісту GCP-2 після введення  $H_2S$ -напроксену було у більшій мірі  $8,464 \pm 0,342$  пг/мл, ніж під час дії NaHS ( $9,938 \pm 0,579$ ) пг/мл у щурів з напроксеновим езофагітом. Це може свідчити про ефект АТВ-346 за рахунок вивільнення  $H_2S$ , який нівелював цитолітичні ефекти блокування активності COX.

Оскільки, зміни цілісності СОС і прояви запалення нерозривно пов'язані між собою, зменшення прозапальних цитокінів на тлі введення NaHS та  $H_2S$ -напроксену є додатковим свідченням доцільності подальшої розробки та опрацювання новітніх безпечних  $H_2S$ -NSAIDs. Враховуючи інтерес до профілактики порушень проліферації застосуванням аспірину, ми порівняли ефекти разового та 9-денного впливу ASA і  $H_2S$ -ASA. Гістологічні дослідження засвідчили збільшення деструктивних пошкоджень СОС за умов поєднання ASA з індукцією ВІС, які характеризувалися руйнуванням епітеліальної пластинки, у деяких випадках до базальної мембрани, геморагіями, сладжем і тромбоутворенням, зоною набряку, реорганізацією компонентів підслизової основи. За використання  $H_2S$ -ASA 9 днів, зміни ГІУ (рис. 6.а) практично не відрізнялися від значень, отриманих під час разового введення  $H_2S$ -ASA ( $p < 0,01$ ) і ГІУ СОС був у 2 рази меншим, ніж після класичного ASA ( $p < 0,001$ ).

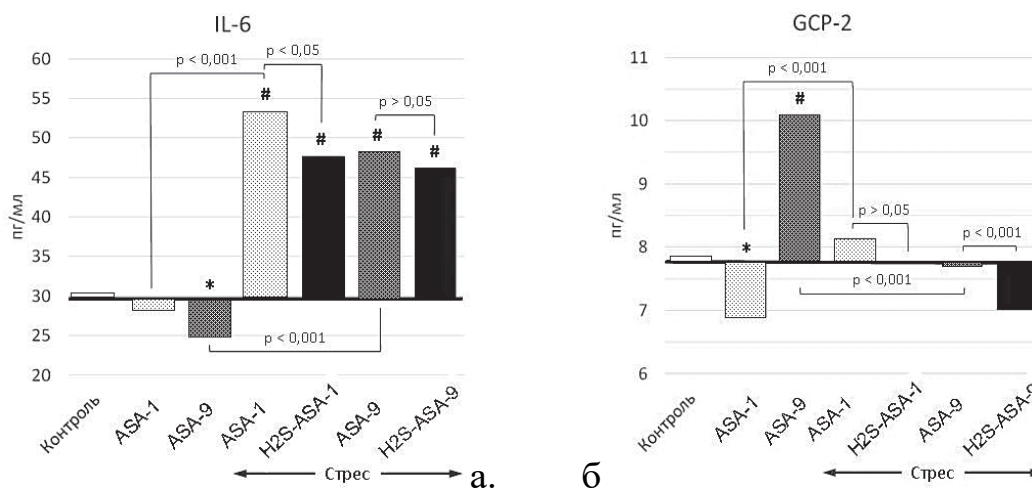


**Рис. 6.** Значення гістологічного індексу ураження (а) і гематокриту (б) у щурів за умов аспіринового-езофагіту введенням (*per os*) ASA (10 мг/кг/добу та 9 діб) і H<sub>2</sub>S-ASA (17,5 мг/кг/добу та 9 діб); \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$  vs контролю.

Після разового введення ASA показники гематокриту (рис. 6.б) суттєво не змінювалися, тоді як поєднання тривалого застосовування та індукції ВІС спричиняло зменшення на 25% ( $37,00 \pm 1,00$ ) vs до контролю ( $p < 0,01$ ). Натомість, якщо застосовували H<sub>2</sub>S-ASA, то суттєвих змін гематокриту не було відносно контролю. Тривале введення впродовж 9 діб сприяло зменшенню вмісту ІЛ-6 до ( $24,81 \pm 1,05$ ) пг/мл, тобто на 15% порівняно з показниками групи контролю ( $p < 0,05$ ). Захисні реакції за умов індукції стресу та разового або тривалого застосування ASA та H<sub>2</sub>S-ASA мали практично однакову спрямованість (рис. 7).

В обох серіях досліджень H<sub>2</sub>S-ASA мав виразну протизапальну дію, зменшуючи вміст ІЛ-6 на 25% (разове введення) порівняно з показниками групи, яким вводили класичний аспірин ( $53,37 \pm 4,31$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ) і на 15% у разі індукції стресу після дев'ятикратного введення засобу ( $(48,32 \pm 2,68)$  пг/мл,  $p < 0,001$  vs до контролю).

Вивчення впливу H<sub>2</sub>S на динаміку захисних реакцій за змінами вмісту GCP-2 у щурів після введення класичного аспірину та H<sub>2</sub>S-аспірину показало, що аспірин спричинив збільшення до  $10,10 \pm 0,95$  пг/мл, або на 35% більше відносно контролю ( $p < 0,01$ ). Використання одноразового введення H<sub>2</sub>S-ASA у поєднанні з дією ВІС не вплинуло на вміст GCP-2, що був аналогічним до контрольної групи ( $p > 0,05$ ), тоді як дія ASA збільшила суттєво вміст GCP-2 до  $8,140 \pm 0,223$  пг/мл ( $p < 0,01$ ) порівняно до показників щурів, яким не індукували ВІС. Порівняння стану захисних реакцій в умовах введення 9-и діб ASA і H<sub>2</sub>S-ASA та індукції ВІС показало, що H<sub>2</sub>S-ASA мав протизапальну дію у більшій мірі, ніж ASA ( $p < 0,001$ ). Отже, збільшення кількості введень ASA сприяє збільшенню проявів прозапальних реакцій, пов'язаних з ІЛ-6 і GCP-2, тоді як застосування H<sub>2</sub>S-ASA не виявляло тенденції до інтенсифікації запалення. Отримані результати дають підстави припустити, що протизапальна, антиадгезивна та цитопротекторна дії H<sub>2</sub>S можуть бути віднесені до ефектів H<sub>2</sub>S-ASA та пояснювати генез езофагопротекторної дії H<sub>2</sub>S-ASA. Такі результати можна використати у перспективі для обґрунтування застосовування H<sub>2</sub>S-ASA в якості безпечного засоба для профілактики та лікування хронічного запалення.



**Рис. 7.** Значення IL-6 (а) і GCP-2 (б) у щурів за умов езофагіту введенням (*per os*) ASA (10 мг/кг/добу та 9 діб) і H<sub>2</sub>S-ASA (17,5 мг/кг/добу та 9 діб); \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,01$  vs контролю.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено наукове завдання про визначення ролі гідроген сульфїду в механізмах цитопротекції та адаптаційно-компенсаторних реакцій СОС за індукції пошкоджень бар'єрної функції стравоходу тетрахлорметаном, гіперглікемією, блокуванням активності систем H<sub>2</sub>S/цистатіонін- $\gamma$ -ліази, H<sub>2</sub>S/цистатіонін- $\beta$ -синтази та модифікації синтезу ейкозаноїдів, під час поєднання зі стресом і введенням NaHS, напроксену, аспірину, H<sub>2</sub>S-напроксену та H<sub>2</sub>S-аспірину.

1. Встановлено значення H<sub>2</sub>S у забезпеченні цитопротекторних та адаптаційно-компенсаторних механізмів за умов порушення бар'єрної функції стравоходу застосуванням тетрахлорметану, високовуглеводного харчування, гальмуванням активності систем H<sub>2</sub>S/цистатіонін- $\gamma$ -ліази, H<sub>2</sub>S/цистатіонін- $\beta$ -синтази і модифікації синтезу ейкозаноїдів; індукцією стресу та їхнім поєднанням. Отримані зміни характеризувались ознаками, що відповідають неерозивному езофагіту і NSAIDs-асоційованої езофагопатії, тому запропонований спосіб можна використовувати для вивчення бар'єрної функції стравоходу.

2. Цитолітичний вплив тетрахлорметану спричинив порушення бар'єрної функції стравоходу, що підтверджено результатами гістологічного аналізу: гіперкератинізація поверхневого шару, виразний підслизовий набряк, відшарування епітеліальної пластинки від підслизової основи, деструктивні зміни у сполучній та м'язовій тканинах стравоходу, тоді як застосування донорів синтезу сірководню нівелювало ці зміни.

3. Доведено, що поєднання стресу та модифікованого біосинтезу сірководню та ейкозаноїдів асоціюється зі змінами бар'єрної функції стравоходу, формуванням деструктивних змін і запалення, гістологічний індекс ураження становить 6-7 балів, з реорганізацією підслизової основи та мікроциркуляції СОС, зниженням гематокриту (32-36%). Це підвищує чутливість епітеліального бар'єра стравоходу до ulcerогенних чинників порівняно з контролем.

4. Зниження вмісту H<sub>2</sub>S на тлі блокування активності H<sub>2</sub>S/цистатіонін- $\gamma$ -ліази,

H<sub>2</sub>S/цистатіонін-β-синтази систем за умов високовуглеводного харчування спричиняє порушення бар'єрної функції стравоходу, розвиток неерозивного езофагіту і дисрегуляцію цитокинової секреції із надлишковим синтезом прозапального IL-17 на 32% (p<0,001) і зниженням вмісту протизапального IL-10 на 25% (p<0,05), як наслідок знижуються природні захисні властивості СОС і виникають деструктивні зміни епітеліального бар'єра та ендотеліальна дисфункція у підслизовій основі стравоходу.

5. Введення донора сірководню NaHS забезпечує відновлення епітеліального бар'єру стравоходу за рахунок виразного вазотропного, цитопротекторного та протизапального ефектів, зменшення вмісту IL-6 на 30% (p<0,05), GSP-2 на 50% (p<0,001) порівняно з даними щурів, що отримували плацебо, та зменшує чутливість до індукції NSAIDs-асоційованої езофагопатії зі зменшенням секреції IL-6 – на 25% (p<0,001) та GCP-2 – на 50% (p<0,001) порівняно до тварин, що отримували плацебо.

6. Вплив H<sub>2</sub>S-напроксену, H<sub>2</sub>S-ацетилсаліцилової кислоти спричинив збереження цілісності слизової оболонки стравоходу та зниження чутливості до розвитку стрес-індукованих пошкоджень. Дія H<sub>2</sub>S-ASA за умов 9 денного введення спричинила зменшення гістологічного індексу ураження стравоходу у 2 рази (p<0,001) і зменшення вмісту IL-6 на 21% (p<0,001), GCP-2 на 50% (p<0,001) у сироватці крові порівняно з тваринами, що отримували аспірин. Таким чином, гібридні H<sub>2</sub>S-асоційовані NSAIDs чинять виразний цитопротекторний вплив на бар'єрну функцію, про що свідчить зменшення проульцерогенної активності на стравохід порівняно з класичними аналогами.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Cytoprotective effects of hydrogen sulfide in novel rat models of non-erosive esophagitis / O.S. Zayachkivska, O.M. Havryluk, N.R. Hrysevych, N.S. Bula, O.I. Grushka, J.L. Wallace // PloS one. – 2014. – №9 (10). – P. 1-8. *(Видання включено до бази Scopus. Здобувачем опрацьовані сучасні літературні джерела з тематики дисертаційної роботи, виконано фрагмент експериментальної частини роботи, пов'язаної з вивченням цитологічного впливу гіперглікемії та модифікації біосинтезу сірководню).*

2. Effect of CCl4 and blocking H<sub>2</sub>S biosynthesis on oesophageal mucosa rats: model of nonerosive oesophagitis / D.L. Khyrivska, N.R. Hrytsevych, N.S. Bula, I.O. Pshyk- Titko, M.Y. Savytska, O.S. Zayachkivska, E.M. Havryluk // Folia Medica Craoviensia. – 2014. – №54(4). – P. 79-90. *(Видання включено до бази Scopus. Здобувачем проведено аналіз сучасної наукової літератури і виконано гістоморфологічні дослідження, зроблено експериментальні дослідження, пов'язані із застосуванням сполук донорів сірководню в умовах неерозивного езофагіту, узагальнення результатів, підготовку статті до друку).*

3. Exposure to non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and suppressing hydrogen sulfide synthesis leads to altered structure and impaired function of the oesophagus and oesophagogastric junction / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, D.L. Khyrivska, E.M. Gavrilyuk, J.L. Wallace // Inflammopharmacology. – 2015. – №23(2-3). – P. 91-99. *(Видання включено до бази Scopus. Здобувачем проведено*



*експериментальну частину роботи, пов'язану з моделюванням медикаментозної езофагопатії за умов зміни біосинтезу сірководню, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).*

4. Цитопротекторні ефекти гідроген сульфід-спорідненої ацетилсаліцилової кислоти на слизову оболонку стравоходу (доклінічні дослідження) / О.С. Заячківська, Н.С. Була, Я.М. Павловський, І.О. Пшик-Тітко, О.М. Гаврилюк // Сучасна гастроентерологія. – 2017. – №1(93). – С. 15-21. *(Здобувачем проведено експериментальну частину роботи, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовка статті до друку).*

5. Була Н.С. Експресія GCP-2 і IL-6 як інструмент оцінки впливу гідроген сульфід-асоційованого напроксену до і після індукції стресу (експериментальне дослідження) / Н.С. Була // Вісник проблем біології і медицини. – 2017. – Вип. 1, Т. 3. – С. 107-110. *(Видання включено до міжнародних наукометричних баз. Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу ульцерогенних чинників за умов стресу на вміст цитокінів, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовка статті до друку).*

6. Effect of hydrogen sulfide-releasing aspirin on esophageal and gastric mucosa compromised by stress injury / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, I.O. Pshyk- Titko, E.M. Gavrilyuk, O.I. Grushka, J.L. Wallace // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2017. – №89. – P. 107-101. *(Здобувачем проведено фрагмент експериментальних досліджень, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).*

7. H<sub>2</sub>S-похідні нестероїдних протизапальних препаратів як нові модулятори цілісності слизової оболонки стравоходу та шлунка / Н.С. Була, Д.Л. Хирівська, О.М. Гаврилюк, О.С. Заячківська // Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки. – Львів, 2015. – Т. 41, №26. – С. 53-63. *(Здобувачем проведено аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовка статті до друку).*

8. Influence of Hydrogen Sulfide-releasing aspirin on mucosal integrity of esophageal and gastric mucosa / J.L. Wallace, I.O. Pshyk-Titko, M. Muscara, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, E.M. Gavrilyuk, O.S. Zayachkivska // Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки. – Львів, 2015. – Т.43, №27. – С. 63-74. *(Здобувачем виконано фрагмент експериментальної частину роботи, пов'язану з моделюванням впливу H<sub>2</sub>S-аспірину на бар'єрну функцію стравоходу, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку статті до друку).*

9. Цитопротекторні впливи сірководню в умовах хронічного ураження проксимального відділу травної системи нестероїдними протизапальними препаратами (експериментальні дослідження) / Н.С. Була, Д.Л. Хирівська, О.М. Гаврилюк, О.С. Заячківська // XIV З'їзд Всеукраїнського Лікарського Товариства. VI Конгрес Південно-Східно Європейського Медичного Форуму, Одеса, 9-12 вересня 2015р. – С. 403. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження СОС за умов медикаментозного езофагіту, впливу стресу та зміни синтезу H<sub>2</sub>S, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку*

тези до друку).

10. Роль ендотеліальної дисфункції в збереженні цілості епітеліального бар'єру проксимального відділу травної системи / О.С. Заячківська, Н.С. Була, І.О. Пшик-Тітко, Д.Л. Хирівська // Кровообіг та гемостаз. – 2015. – №1(2). – С. 87-88. *(Здобувачем проведено експериментальну частину роботи, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

11. Experimental esophagitis research: new insight on animal models and translational aspects / O.S. Zayachkivska, I.O. Pshyk-Titko, N.R. Hrytsevych, N.S. Bula, D.L. Khyrivska, M.Y. Savytska, O.M. Gavrilyuk // RECOOP HST Association. Bridges in Life Sciences: 9th Annual Scientific conferences (2014 May 27-June 1), Croatia. – 2014. – P. 90. *(Здобувачем проведено аналіз сучасної наукової літератури і виконано фрагмент досліджень, пов'язаний з застосуванням сполук донорів сірководню в умовах медикаментозної езофагопатії, підготовку тези до друку).*

12. Protective role of H<sub>2</sub>S-derivative NSAIDs against stress-related esophageal and gastric mucosal injury. Summer School on Stress. From Hans Selye's original concept to recent advances. / N.S. Bula, D.L. Khyrivska, E.M. Gavrilyuk, O.S. Zayachkivska // Program & Abstracts; University Hospital Center and Grenoble Institute of Neurosciences (2015 June 29-July 2). – Grenoble, 2015. – P. 27. *(Здобувачем проведено дослідження, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

13. Cyclooxygenase-dependent modulation of gastro-esophageal mucosal integrity by hydrogen sulfide against stress-induced injury / I.O. Pshyk-Titko, N.S. Bula, D.L. Khyrivska, Y.V. Bisyarin, E.M. Havryluk, O.S. Zayachkivska // Digestive Diseases And Sciences: 15th International Conference of Ulcer Research (2015 September 1), Ottawa. – [Ottawa], 2015. – №60 (9). – P. 2551-2552. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

14. Translational study of esophageal damage: dreams and barriers / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, I.O. Pshyk-Titko, N.R. Hrytsevych, D.L. Khyrivska // Digestive Diseases and Sciences: 15th International Conference of Ulcer Research (2015, September 1), Ottawa. – [Ottawa], 2015. – №60 (9). – P. 2558. *(Здобувачем проведено фрагмент досліджень, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

15. Physiological aspects of H<sub>2</sub>S-aspirin influence on esophageal and mucosa integrity / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, E.M. Gavrilyuk, J.L. Wallace // RECOOP 2015 Annual Project Review 6th TriNet Meeting, Prague. RECOOP HST Association (2015, October 15-18). – Prague, 2015. – P. 37. *(Здобувачем проведено фрагмент досліджень, пов'язаний з моделюванням впливу H<sub>2</sub>S-аспірину на слизову оболонку стравоходу, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

16. H<sub>2</sub>S-releasing aspirin exerts protective effect in esophageal and gastric mucosal stress-associated injury / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, E.M. Gavrilyuk, J.L. Wallace // The FASEB Journal. – 2016. – P. 1271. *(Здобувачем проведено аналіз сучасної наукової літератури і виконано гістоморфологічні дослідження,*

*експериментальні дослідження, пов'язані з застосуванням H<sub>2</sub>S-аспірину на СОС, узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

17. The comparison of hydrogen sulfide NSAID derivates in the modulation of gastro-esophageal integrity / I.O. Pshyk-Titko, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, O.S. Zayachkivska // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – P. 88. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження СОС після H<sub>2</sub>S-аспірину, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

18. Bula N.S. Drug-induced esophagitis: new look on old problem / N.S. Bula // Proceedings of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. – Lviv, 2016. – Vol. 47, №2. – P. 109-110. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження впливу ульцерогенних чинників за умов стресу на вміст цитокінів, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

19. Translational aspects of place of hydrogen sulfide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs on the tomorrow's landscape for stress associated disorders / N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, V.O. Student, O.V. Revenko, J.L. Wallace, O.S. Zayachkivska // Proceedings of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. – Lviv, 2017. – Vol.49, №1. – P. 21. *(Здобувачем виконано фрагмент експериментальної частини роботи, пов'язаної з дією модифікації синтезу сірководню на стравохід, підготовку тези до друку).*

20. Bula N.S. Serum GCP-2 and IL-6 are associated with vascular dysfunction and modification of gaseous mediator H<sub>2</sub>S pathway during stress / N.S. Bula // 2<sup>nd</sup> Regional Congress of Physiological Societies and 4th Congress of Croatian Physiological Society (2017, September 21-24). – Dubrovnik, 2017. – P. 61. *(Здобувачем проведено експериментальну частину роботи, виконано аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

21. The role of H<sub>2</sub>S in stress: new insight on animal models and translational aspects / O.S. Zayachkivska, Y.M. Pavlovsky, V.O. Student, O.V. Revenko, N.S. Bula // 8th RECOOP Annual Project Review Meeting, Croatia. RECOOP HST Association (2017, October 19-21). – Dubrovnik, 2017. – P. 81. *(Здобувачем проведено фрагмент експериментальної частини роботи, аналіз і узагальнення результатів, їх статистичну обробку, підготовку тези до друку).*

## АНОТАЦІЯ

**Була Н.С. Роль гідроген сульфїду в механїзмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.03 – нормальна фізіологія. – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2018.

Вперше досліджено механізми цитопротекції слизового бар'єру стравоходу у аспекті фізіологічної ролі гідроген сульфїду (H<sub>2</sub>S) за фізіологічних умов та на моделях неерозивного та медикаментозного езофагітів, індукованих цитотоксичним впливом тетрахлорметану, висококалорійним високовуглеводним харчуванням, гальмуванням активності систем H<sub>2</sub>S/цистатіонін-γ-ліази, H<sub>2</sub>S/цистатіонін-β-синтази, нестероїдними протизапальними препаратами

(NSAIDs) для моделювання біосинтезу ейкозаноїдів та застосування  $H_2S$ -асоційованих NSAIDs за структурно-функціональними змінами бар'єрної функції стравоходу, показниками гематокриту, вмістом GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17. Доведено, що розвиток неерозивного езофагіту пов'язаний з дією  $H_2S$ . Показано, що  $H_2S$ -асоційовані NSAIDs чинять езофагопротекторний і захисний вплив на бар'єрну функцію СОС і прояви протизапальних властивостей на відміну від дії класичних NSAIDs, що дозволяє зробити припущення про доцільність їхніх подальших доклінічних та клінічних досліджень.

**Ключові слова:** фізіологія травлення, цитопротекція, ульцерогенез, слизова оболонка стравоходу, гідроген сульфід ( $H_2S$ ), цистатіонін- $\gamma$ -ліази, цистатіонін- $\beta$ -синтази, цитокіни, GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17.

### АННОТАЦІЯ

**Була Н.С. Роль сульфід водорода в механізмах цитопротекції слизової оболонки пищевода.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – нормальная физиология. – Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2018.

Впервые исследованы механизмы цитопротекции слизистого барьера пищевода в аспекте физиологической роли сульфид водорода ( $H_2S$ ) при физиологических условиях и на моделях незрозивного и медикаментозного эзофагитов, индуцированных цитотоксическим влиянием тетрахлорметана, высококалорийным высокоуглеводным питанием, ингибированием активности систем  $H_2S$ /цистатіонін- $\gamma$ -ліазы,  $H_2S$ /цистатіонін- $\beta$ -синтазы, нестероидными противовоспалительными препаратами (NSAIDs) для моделирования биосинтеза ейкозаноидов и  $H_2S$ -ассоциированными NSAIDs, учитывая структурно-функциональные изменения барьерной функции пищевода, данные гематокрита, GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17. Установлено, что развитие незрозивного эзофагита связано с действием  $H_2S$ . Утверждено, что  $H_2S$ -ассоциированные NSAIDs оказывают эзофагопротекторный и защитное влияние на барьерную функцию СОС и проявления противовоспалительных свойств в отличие от классических NSAIDs, что позволяет сделать предположение о целесообразности их дальнейших доклинических и клинических исследований.

**Ключевые слова:** физиология пищеварения, цитопротекция, слизистая оболочка пищевода,  $H_2S$ , цистатіонін- $\gamma$ -ліаза, цистатіонін- $\beta$ -синтаза, цитокины, GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17.

### ANNOTATION

**Bula N.S. The role of hydrogen sulfide in mechanisms of esophageal mucosa cytoprotection.** – The manuscript.

Dissertation to obtain a scientific degree of the Candidate of Medical Sciences in specialty 14.03.03 – Normal physiology. – National Pirogov Memorial Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2018.

The purpose of the study was to determine the role of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) in the mechanisms of esophageal mucosa (EM) cytoprotection during animal experiments on

rats. The objective of the study was to determine the value of endogenous sulfur-containing compounds and modification of transsulfuration pathway in ensuring integrative barrier and adaptive-and-compensatory esophageal functions during induction of ulcerogenesis occurring through toxic effects, hyperglycemia and modification of eicosanoid synthesis. Cytolytic damage to the esophageal mucosa was simulated by administering toxic effect of Carbon tetrachloride, blocking H<sub>2</sub>S biosynthesis while removing or changing B<sub>6</sub>-dependent enzyme catalytic activity: cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE, EC 4.4.1.1), cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS, EC 4.2.1.22 ), induction of acute stress and modification of eicosanoid biosynthesis. In order to study H<sub>2</sub>S influence on the state of EM barrier function, compounds increasing its release were used: inorganic H<sub>2</sub>S sodium hydrogen sulfide (NaHS) and hybrid hydrogen sulfide derivatives of NSAIDs. They were administered by injecting the animals with the following solutions: H<sub>2</sub>S-associated naproxen (H<sub>2</sub>S-naproxen, ATB-346); H<sub>2</sub>S-associated acetylsalicylic acid (5-ASA, ATB-340).

The study discovered that the use of toxic cytolytic effects by different origin, including inhibition of activity H<sub>2</sub>S/CSE and H<sub>2</sub>S/CBS systems lead to the disorder of EM cytoprotection. The cytolytic effect of such simulation on animals caused a decrease in the natural EM protective properties and disorder of adaptive and compensatory mechanisms through the induction of destructive changes in the epithelial barrier and endothelial dysfunction, as well as altering serum content of GCP-2 and IL-6, IL-10, IL-17. The proposed method of simulating non-erosive and erosive-ulcerative EM lesions and esophagogastric junction due to H<sub>2</sub>S endogenous biosynthesis disorder may be recommended for use in experimental medicine and preclinical drug studies. Changes revealed in EM when H<sub>2</sub>S-associated NSAID derivatives (H<sub>2</sub>S-naproxen) were used, showed a significantly lesser degree of ulcerogenic activity on EM. H<sub>2</sub>S-naproxen and H<sub>2</sub>S-aspirin contributes to enhancement of EM protective properties. It was found that daily administration of H<sub>2</sub>S -associated NSAIDs (H<sub>2</sub>S-naproxen and H<sub>2</sub>S-associated acetylsalicylic acid) compared with the similar routine of classical NSAIDs administration increases anti-inflammatory and adaptive-and-compensatory EM properties, reduces degradation of epithelial barrier processes and signs of endothelial dysfunction in the esophageal mucosa. Thus, these drugs may be recommended as safe treatment and prophylactic drugs for anti-inflammatory therapy.

**Keywords:** Physiology of digestion, cytoprotection, mucosal defence, esophageal mucosa, Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S), Cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE), Cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS), GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17.

**СПИСОК СКОРОЧЕНЬ**

ГІУ – гістологічний індекс ураження  
ВІС – водно-іммобілізаційний стрес  
ЛНМУ – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
НАН – Національна академія наук  
НАМН – Національна академія медичних наук  
СОС – слизова оболонка стравоходу  
АSА – ацетилсаліцилова кислота  
АТВ-340 – H<sub>2</sub>S-ацетилсаліцилова кислота  
АТВ-346 – H<sub>2</sub>S-напроксен  
СBS – цистатіонін-β-синтази  
ССl<sub>4</sub> – тетрахлорметан  
СНН – карбоксиметил-гідроксиламінгеміхлорид  
СОХ – циклооксигеназа  
СSE – цистатіонін-γ-ліази,  
GCP-2 – гранулярний хемотактильний протеїн-2  
HSD – висококалорійне високовуглеводне харчування  
H<sub>2</sub>S – гідроген сульфід (сірководень)  
H<sub>2</sub>S-NSAIDs – H<sub>2</sub>S-нестероїдні протизапальні препарати  
ІL-6 – інтерлейкін 6  
ІL-10 – інтерлейкін 10  
ІL-17 – інтерлейкін 17  
NaCl – натрій хлорид  
NaHS – натрій гідрогенсульфід  
NSAIDs – нестероїдні протизапальні препарати  
РАG – пропаргілгліцин

---

Підписано до друку 23.11.2018 р. Замовл. № 691.  
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,8 Друк офсетний.  
Наклад 100 примірників.

---

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

