

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ім. М. І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БУЛА НАЗАР СТЕПАНОВИЧ

УДК 612.387:546.221

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.03.03 – нормальна фізіологія

222 Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Н.С. Була

Науковий керівник: Заячківська Оксана Станіславівна, доктор медичних наук,
професор

Львів, Вінниця – 2018

АНОТАЦІЯ

Була Н.С. Роль гідроген сульфїду в механїзмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу. Квалїфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.03 – «нормальна фізіологія». Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2018; Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2018.

Провідне місце у збереженні цілісності бар'єрної функції стравоходу належить простагландин-залежним і простагландин-незалежним механїзмам, порушення яких спричиняє різноманїтні захворювання стравоходу. Взаємодія системи циклу арахїдонової кислоти з системами газових медіаторів: Гїдрогену сульфїду (H_2S), Нітрогену монооксиду та Карбону монооксиду є актуальним напрямом досліджень, проте відсутні відомості щодо впливу H_2S на ранні прояви порушень бар'єрної функції, механїзми адаптації та компенсації слизової оболонки стравоходу (СОС) за дії різних екстремальних чинників.

Експериментальні дослідження виконані для встановлення ролі H_2S у бар'єрній функції, що забезпечуються цитопротекторними механїзмами СОС за умов індукції пошкоджень різної етіології.

Завдання дослідження стосувались визначення значення ендogenous H_2S у забезпеченні бар'єрної функції та адаптаційно-компенсаторних можливостей стравоходу за умов цитолїзу після токсичного впливу тетрахлорметану, гіперглікемії та модифікації ендogenous вмісту ейкозаноїдів; з'ясування ролі H_2S у фізіологічних реакціях і структурно-функціональних змінах епітеліального бар'єра стравоходу за умов зміни активності систем утворення сірководню H_2S /цистатіонін- γ -ліази (CSE), H_2S /цистатіонін- β -синтази (CBS) або впливу його донора NaHS, модифікації біосинтезу ейкозаноїдів і застосування гїбридного H_2S -асоційованого нестероїдного протизапального препарату напроксену (H_2S -напроксен, АТВ-

346) та за умов моделювання ульцерогенних пошкоджень поєднанням стресу та вилученням CSE/H₂S системи синтезу H₂S. Окрім того, аналізували чутливість слизової оболонки стравоходу до впливу ульцерогенних чинників після введення класичного аспірину (ацетилсаліцилова кислота, ASA) й гібридного H₂S-асоційованого аспірину (5-ASA, АТВ-340) у різні терміни застосування. Характер впливу H₂S на прозапальні реакції оцінювали за діапазоном вмісту IL-6, IL-10, IL-17 і GCP-2 та ступенем руйнування епітеліального бар'єра стравоходу під час модифікації біосинтезу сірководню.

Об'єктом дослідження виступили фізіологічні механізми бар'єрної функції, захисних та адаптаційно-компенсаторних реакцій слизової оболонки стравоходу за умов моделювання ульцерогенних пошкоджень зміною каталітичної активності біосинтезу H₂S.

Був визначений наступний предмет дослідження: особливості структурно-функціонального стану бар'єрної функції слизової оболонки стравоходу щурів; про- та протизапальна активність цитокін-чутливих сигнальних шляхів в умовах норми, модифікування біосинтезу H₂S та ейкозаноїдів; застосування H₂S-асоційованих похідних NSAID.

Дослідження були проведені на 139 статевозрілих щурах самцях, віком 4-6 місяців, вагою 170-220 г, що утримувались в стандартних умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Експериментальні серійні дослідження виконано у три етапи. Щурів було розділено на групи. Для вилучення H₂S/CSE системи застосовували пропаргілгліцин (PAG), для вилучення H₂S/CBS системи – карбоксиметил-гідроксиламінгеміхлорид (СНН). Для збільшення ендогенного синтезу H₂S – натрій гідрогенсульфід (NaHS) та гібридні сірковмісні похідні нестероїдних протизапальних препаратів: H₂S-асоційований напроксен (H₂S-напроксен, АТВ-346), H₂S-асоційовану ацетилсаліцилову кислоту (5-ASA, АТВ-340).

У 1-му етапі для дослідження бар'єрної функції стравоходу було дві серії досліджень. У 1-й серії пошкодження СОС здійснювали шляхом

токсичного впливу тетрахлорметану (CCl_4): 1 група – контролю (щурі, що отримували плацебо – 0,9% розчин NaCl ; 2, 3, 4 групи – щурі, яким застосовували CCl_4 в дозі 0,3 мл/200 г двічі на добу *per os* і вводили внутрішньоочеревинно (в/о) по групам: 2) плацебо, 3) напроксен у дозі 30 мг/кг/добу, 4) H_2S -асоційований напроксен (H_2S -напроксен, АТВ 346) у дозі 43,5 мг/кг/добу. У 2-й серії щурам пошкодження СОС здійснювали після застосування 28-денного гіперкалорійного високовуглеводного харчування і модифікування ендогенного синтезу H_2S . Тварин групували: 1) контроль з плацебо, в/о; 2) PAG у дозі 25 мг/кг/добу, в/о; 3) CHN у дозі 3 ммоль/кг/добу, в/о, 4) NaHS дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о.

У 2-му етапі досліджень моделювання пошкодження бар'єрної функції СОС здійснювали модифікуванням ендогенного синтезу H_2S , ейкозаноїдів та в поєднанні з індукцією гострого стресу. Тварин розділяли по групам: 1) контроль з плацебо, в/о; 2) PAG у дозі 25 мг/кг/добу, в/о; 3) CHN у дозі 3 ммоль/кг/добу, в/о, 4) NaHS у дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о, 5) плацебо, в/о та індукували гострий стрес; 6) NaHS у дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о та індукували гострий стрес. Щурі 7, 8, 9, 10 і 11 груп отримували напроксен у дозі 30 мг/кг, *per os* упродовж 9 діб, 8) в поєднанні з PAG у дозі 25 мг/кг/добу, в/о; 9) в поєднанні з NaHS у дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о; 10) в поєднанні з індукцією стресу і PAG у дозі 25 мг/кг/добу, в/о; 11) в поєднанні з індукцією стресу і NaHS у дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о; 12) H_2S -напроксен у дозі 14,5 мг/кг/добу, *per os*, плацебо, в/о та індукція стресу.

У 3-му етапі з метою вивчення впливу H_2S на стан бар'єрної функції СОС та адаптаційно-компенсаторні властивості СОС застосовували класичний аспірин і гібридний H_2S -аспірин та індукцію гострого водно-імобілізаційного стресу. Тварин розділяли по групам: 1) контроль з плацебо, *per os*; 2) аспірин у дозі 10 мг/кг/добу, *per os*, 3) аспірин у дозі 10 мг/кг/добу, упродовж 9 днів *per os*, 4) аспірин у дозі 10 мг/кг/добу, *per os* та індукція стресу; 5) H_2S -аспірин у дозі 17,5 мг/кг/добу, *per os* та індукція стресу; 6) аспірин у дозі 10 мг/кг/добу упродовж 9 діб, *per os* та індукція стресу; 7) H_2S -

аспірин у дозі 17,5 мг/кг/добу, упродовж 9 діб, *per os* та індукція стресу. Введення PAG, СНН, NaHS, АТВ-346, АТВ-340 здійснено у дозах, апробованих в лабораторії J.L. Wallace (2012-2017).

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) використанням параметричних та непараметричних методів оцінки. Визначали середні значення за кожною ознакою та стандартні відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами при нормальному розподілі визначали за t-критерієм Стьюдента.

Всі дослідження з лабораторними тваринами проводилися з дотриманням вимог біоетики (протокол протокол №2 від 24 лютого 2014 р.).

Під час проведення дослідження визначено роль гідроген сульфіду в механізмах цитопротекції СОС під час індукції неерозивного езофагіту тетрахлорметаном, гіперглікемією, блокуванням активності систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази, H_2S /цистатіонін- β -синтази та модифікації синтезу ейкозаноїдів, під час поєднання зі стресом і введенням NaHS за умов медикаментозного езофагіту з використанням напроксену, аспірину та H_2S -напроксену та H_2S -аспірину. Цитолітична дія унаслідок такого моделювання на тваринах спричинила руйнування бар'єрної функції стравоходу і зниження природних захисних властивостей СОС і порушення адаптаційно-компенсаторних механізмів унаслідок деструктивних змін епітеліального бар'єру та ендотеліальної дисфункції та зміни секреції GCP-2 і IL-6, IL-10, IL-17. Встановлено значення активності систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази і H_2S /цистатіонін- β -синтази у забезпеченні бар'єрної функції стравоходу для забезпечення вазотропного компонента цитопротекторних механізмів. Гальмування активності активності систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази і H_2S /цистатіонін- β -синтази підвищує чутливість епітеліального бар'єра стравоходу до ульцерогенних чинників порівняно з контролем. Доведено цитопротекторну роль H_2S та можливість моделювання неерозивного

езофагіту за рахунок гальмування систем H_2S /цистатіонінін- γ -ліази, H_2S /цистатіонінін- β -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 H_2S 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-17, які опосередковують про- та протизапальні зміни в організмі.

Досліджено, що довготривале 9-денне застосування H_2S -NSAIDs - H_2S -напроксену, H_2S -аспірину сприяє посиленню захисних властивостей СОС. З'ясовано, що щоденне введення H_2S -асоційованих NSAIDs (H_2S -напроксен і H_2S -асоційована ацетилсаліцилова кислота) порівняно з аналогічним режимом введення класичних NSAIDs збільшує протизапальні та адаптаційно-компенсаторні властивості СОС, зменшує процеси деградації епітеліального бар'єру та ознаки ендотеліальної дисфункції у слизовій оболонці стравоходу, таким чином ці препарати можуть бути рекомендовані як безпечні лікувально-профілактичні засоби для протизапальної терапії. Вперше встановлено, що наслідком застосування H_2S -NSAIDs є зниження чутливості СОС до цитоагресивного впливу ейкозаноїдів. Таким чином, гібридні сірковмісні похідні NSAIDs чинять виразний цитопротекторний вплив на бар'єрну функцію про що свідчить зменшення ульцерогенної активності щодо СОС порівняно з дією класичних аналогів. Отримані результати слугують підґрунтям для подальшого вивчення H_2S -NSAIDs, як безпечних лікарських засобів, що зберігають терапевтичну протизапальну активність і володіють езофагопротекторними властивостями.

Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках комп'ютерного тексту і складається з вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, розділів результатів власних досліджень, обговорення результатів, висновків, переліку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована 39 рисунками та 5 таблицями. Список літературних джерел містить 296 найменувань (з них 259 – іноземні).

Ключові слова: фізіологія травлення, цитопротекція, ульцерогенез, слизова оболонка стравоходу, гідроген сульфід (H₂S), цистатіонін-γ-ліази, цистатіонін-β-синтази, цитокіни, GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17.

ANNOTATION

Bula N.S. The role of hydrogen sulfide in mechanisms of esophageal mucosa cytoprotection. Qualifying scientific work on the manuscript copyright.

Thesis for the degree of the Candidate of Medical Sciences, speciality 14.03.03 “Normal Physiology” (222 – Medicine). – Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, 2018; Vinnytsya National Pirogov Memorial Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2018.

The leading place in preserving the integrity of the esophageal barrier function belongs to the prostaglandin-dependent and prostaglandin-independent mechanisms, the impairment of which causes various diseases of the esophagus. The interaction of the arachidonic acid cycle system with gas mediator systems: Hydrogen sulfide (H₂S), Nitrogen monoxide and Carbon monoxide are an important area of research, but there is no evidence of the influence of H₂S on early manifestations of barrier function disorders, mechanisms of adaptation and compensation of the esophagus mucosa (EM) under the influences of various extreme factors.

Experimental studies were dedicated to determine the role of the H₂S system in providing cytoprotective and adaptive-compensatory mechanisms of EM in different animal models of esophagitis. The purpose of the study was to find out the role of hydrogen sulfide (H₂S) in the mechanisms of cytoprotection of the

esophagus mucosa for experimental esophagitis in rats. Today, the research of mechanisms of the esophageal mucosal (EM) is significant for the theoretical and practical value. It is known that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most commonly used drugs with side effects that may cause clinically significant damage to the esophagus and other digestive system structures, as well as cardio-vascular complications, etc. Such a situation requires testing experimental esophageal damage on animal models that are similar to human esophageal pathologies and adequate to the signs of disease with account for good reproductibility and safety of exposure to experimenters. Revealing peculiarities of hydrogen sulfide (H_2S) effects in hybrid H_2S -associated NSAIDs compounds (as compared to classical NSAIDs analogues) on EM protective properties and barrier function and manifesting anti-inflammatory properties will enable to understand the role of H_2S in cytoprotective and ulcerative mechanisms of EM and make assumptions about the feasibility of further preclinical and clinical studies.

The purpose of the study was to determine the role of hydrogen sulfide in the mechanisms of esophageal mucosa cytoprotection during different animal models of esophagitis on rats.

The objective of the study was to determine the role of H_2S and sulfur-containing compounds and modification of H_2S in providing protective and adaptive-compensation functions of esophageal mucosa during injury after the toxic effects of carbon tetrachloride, hyperglycemia and modifications synthesis of eicosanoids; elucidation of the role of H_2S in physiological reactions and structural and functional changes of the esophageal epithelial barrier under conditions of modification activities of cystathion- γ -lipase, cystathion- β -synthase activity, effect of NaHS, donor of hydrogen sulfide synthesis, modification of biosynthesis of eicosanoids and effects of hybrid sulfur-containing derivatives of non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen, in terms of damage induction by combination of stress and inhibition of biosynthesis by H_2S . In addition, to analyze changes of inflammatory reactions range of content of IL-6, IL-10, IL-17 and GCP-2 and the

degree of destruction of esophageal epithelial barrier during biosynthetic modification of hydrogen sulfide, the sensitivity of the esophageal mucosa to the effects of ulcerogenic factors and pro-inflammatory reactions after administration of classical and hybrid-associated H₂S – H₂S-naproxen and H₂S-aspirin in different terms of use.

The object of the study was the physiological mechanisms of protective and adaptive-and-compensatory responses of esophageal mucosa while modeling ulcerogenic lesions by changing catalytic activity of H₂S biosynthesis.

The following research subject was determined: peculiarities of the structural and functional condition of esophageal mucosa barrier function in rats; pro-inflammatory and anti-inflammatory activity of cytokine-sensitive signaling paths under normal conditions, modification of H₂S biosynthesis, eicosanoids and administration of NSAIDs hydrogen sulfide derivatives.

The study was based on 139 male rats, aged 4-6 months with a weight of 170-220 g, which were kept in the standard vivarium of Danylo Halytskyi Lviv National Medical University. Cytolytic damage to the esophageal mucosa was simulated by administering toxic effect of Carbontetrachloride (tetrachloromethane), blocking H₂S biosynthesis while removing or changing B₆-dependent enzyme catalytic activity: cystathionine γ -lyase (CSE, EC 4.4.1.1), cystathionine-B-synthase (CBS, EC 4.2.1.22), induction of acute stress and modification of eicosanoid biosynthesis. In order to study H₂S influence on the state of EM barrier function, compounds increasing its release were used: inorganic H₂S sodium sulfite (NaHS) and hybrid hydrogen sulfide derivatives of NSAIDs. They were administered by injecting the animals with the following solutions: H₂S-associated naproxen (H₂S-naproxen, ATB-346); H₂S-associated acetylsalicylic acid (5-ASA, ATB-340).

The required statistical calculations and diagramming were prepared using IBM PC Pentium computer with STATISTICA for Windows 5.0 software and Microsoft Excel spreadsheets. The distribution of parametric indices in the samples was normal (Gaussian) – Shapiro-Wilk's W-test. Due to the presence of more than

two study groups, parametric characteristics were compared using a post-test analysis (ANOVA unit – analysis of variance), where mean values were compared in pairs using the Newman-Keuls criterion. Data were considered valid when* – $p < 0.05$.

All studies on laboratory animals were conducted in compliance with bioethics requirements. Animals were euthanized by administering lethal doses of thiopental sodium.

In the 1st phase to study of the esophageal barrier function there were two series of experiments. In the first series, the damage to esophageal mucosa (EM) was induced by tetrachloromethane (CCl_4): 1 control group (rats pre-treated by placebo – 0,9% solution NaCl; 2, 3, 4 groups - rats were pre-treated by CCl_4 at 0,3 ml/200 g twice per day *per os* and administered intraperitoneally (ip) in groups: 2) placebo; 3) naproxen in dose 30 mg/kg/day; 4) H_2S -associated naproxen (H_2S -naproxen, ATB-346) in dose of 43,5 mg/kg/day. In the 2nd series, EM lesions were performed on rats after 28 days of hypercaloric high-carbohydrate diet and the modification of endogenous H_2S synthesis. Animals were grouped: 1) control with placebo, ip; 2) PAG at a dose of 25 mg/kg/day, ip; 3) CHH at a dose of 3 mmol/kg/day, ip, 4) NaHS at a dose of 100 $\mu\text{mol/kg/day}$, ip.

In the 2nd phase to study of the esophageal barrier function used modifying the endogenous synthesis of H_2S , eicosanoids, and their combination with the induction of acute stress. Animals were divided into groups: 1) control with placebo, ip; 2) PAG at a dose of 25 mg/kg/day, ip; 3) CHH at a dose of 3 mmol/kg/day, ip, 4) NaHS at a dose of 100 $\mu\text{mol/kg/day}$, ip, 5) placebo, ip and induced acute stress; 6) NaHS in a dose of 100 $\mu\text{mol/kg/day}$, and acute stress was induced. Rats of 7, 8, 9, 10 and 11 groups received naproxen at a dose of 30 mg/kg/day, *per os* for 9 days, additionally animals were pre-treated by 8) PAG at a dose of 25 mg/kg/day, ip; 9) with NaHS in a dose of 100 $\mu\text{mol/kg/day}$, ip; 10) PAG at a dose of 25 mg/kg/day, ip, and stress induction; 11) NaHS in a dose of 100 $\mu\text{mol/kg/day}$, ip and stress induction; 12) H_2S -naproxen at a dose of 14,5 mg/kg/day, *per os*, placebo, ip, and induction of stress.

In the 3rd phase, to study role H₂S on EM barrier function and adaptive-compensatory mechanisms the classical aspirin and hybrid H₂S-aspirin and induction of acute water-immobilization stress were used. Animals were subdivided into groups: 1) control with placebo, *per os*; 2) aspirin at a dose of 10 mg/kg/day, *per os*, 3) aspirin at a dose of 10 mg/kg/day for 9 days *per os*, 4) aspirin at a dose of 10 mg/kg/day, *per os*, and induction of stress ; 5) H₂S-aspirin at a dose of 17,5 mg/kg/day, *per os*, and induction of stress; 6) aspirin at a dose of 10 mg/kg/day for 9 days, *per os* and induction of stress; 7) H₂S-aspirin at a dose of 17,5 mg/kg/day, for 9 days, *per os*, and induction of stress. The administration of PAG, CHH, NaHS, ATB-346, ATB-340 was performed at doses tested by J.L. Wallace (2012-2017). The study discovered that the use of cytolytic effect of tetrachloromethane intoxication, prolonged postprandial hyperglycemia, simulation of changes by distorting the natural stereotype of response of eicosanoids and the activity of H₂S/CSE and H₂S/CBS systems slowdown 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 of GCP-2 and IL-6, IL-10, IL-17 secretion. The proposed method of simulating non-erosive lesions of EM and junction between esophagus and stomach due to the endogenous biosynthesis disorder of H₂S may be recommended for use in experimental medicine and preclinical drug studies as an experimental (on animals) GERD model. Changes revealed in EM when H₂S-associated NSAIDs derivatives (H₂S-naproxen) were used, showed a significantly lesser degree of ulcerogenic activity on EM.

The role of H₂S in the adaptive and compensatory mechanisms of stress-induced damage to the barrier and defence functions of the esophagus was studied for the first time, and activities of H₂S/CSE and H₂S/CBS systems in induction of changes in the level of GCP-2 angiogenic protein (a specific activator of neutrophilic leukocytes) were established. It has been experimentally confirmed

that the use of donor of synthesis H_2S , NaNS leads to enhanced EM integrity and defence control associated with changes in the level of GCP-2, IL-6, IL-10, and IL-17 chemokine secretion, mediating anti- and pro-inflammatory changes in the body.

It was first established that long-term 28-days administration of H_2S -NSAIDs – H_2S -naproxen and H_2S -aspirin contributes to enhancement of EM protective properties. It was found that daily administration of H_2S -associated NSAIDs (H_2S -naproxen and H_2S -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. The effects of H_2S -naproxen, H_2S -acetylsalicylic acid, have been reduced sensitivity to the development of stress-induced lesions. Therefore, hybrid hydrogen sulfide derivative NSAIDs exert distinct effects on protective function of esophageal epithelial barrier by reduction ulcerogenic effect for esophageal mucosa compared with the classical drugs.

Present thesis is printed on 164 pages of computer text and consists of the introduction, review of the literature used, the chapter on the study materials and methods, the chapter on personal study results, discussion of results, conclusions, references and annexes. The paper is illustrated by 39 figures and 5 tables. The list of references consists of 296 titles (259 of which are foreign sources).

Key words: physiology of digestion, cytoprotection, mucosal defence, esophageal mucosa, Hydrogen Sulfide (H_2S), Cystathionine- γ -lyase (CSE), Cystathionine- β -synthase (CBS), GCP-2, IL-6, IL-10, IL-17.

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати 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.

2. Effect of CCl₄ and blocking H₂S 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 Cracoviensia.* – 2014. – №54(4). – P. 79-90.

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.

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.

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.

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.

7. H₂S-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.

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.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

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. Гаврилук, О.С. Заячківська // XIV З'їзд Всеукраїнського Лікарського Товариства. VI Конгрес Південно-Східно Європейського Медичного Форуму, Одеса, 9-12 вересня 2015р. – С. 403.

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.

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.

12. Protective role of H₂S-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.

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.

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.

15. Physiological aspects of H₂S-aspirin influence on esophageal and mucosa integrity / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, E.M. Gavriluk, J.L. Wallace // RECOOP 2015 Annual Project Review 6th TriNet Meeting, Prague. RECOOP HST Association (2015, October 15-18). – Prague, 2015. – P. 37.

16. H₂S-releasing aspirin exerts protective effect in esophageal and gastric mucosal stress-associated injury / O.S. Zayachkivska, N.S. Bula, Y.M. Pavlovsky, E.M. Gavriluk, J.L. Wallace // The FASEB Journal. – 2016. – P. 1271.

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.

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.

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.

20. Bula N.S. Serum GCP-2 and IL-6 are associated with vascular dysfunction and modification of gaseous mediator H₂S pathway during stress / N.S. Bula // 2nd Regional Congress of Physiological Societies and 4th Congress of Croatian Physiological Society (2017, September 21-24). – Dubrovnik, 2017. – P. 61.

21. The role of H₂S 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.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЇ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1 Особливості фізіологічних механізмів цитопротекції та ульцерогенезу в стравоході	27
1.2 Роль газового медіатора гідроген сульфід (H ₂ S) у бар'єрній та захисній функціях епітеліального бар'єру органів травної системи	30
1.3 Фізіологічні механізми розвитку медикаментозної езофагопатії..	34
1.4 Сучасний стан проблеми розробки фізіологічно-обґрунтованих езофагопротекторних засобів та засади їх створення.....	37
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	42
2.1 Об'єкт, етапи та умови дослідження	42
2.2 Фізіологічні методи дослідження.....	48
2.2.1 Методика дослідження впливу H ₂ S у бар'єрній функції слизової оболонки стравоходу за умов експериментального неерозивного езофагіту.....	49
2.2.2 Методика дослідження значення H ₂ S у бар'єрній функції слизової оболонки стравоходу за умов порушення синтезу ейкозаноїдів.....	51
2.2.3 Методика дослідження значення H ₂ S у адаптаційно- компенсаторних механізмах слизової оболонки стравоходу за умов експериментального медикаментозного езофагіту	52
2.2.4 Визначення особливостей адаптаційно-компенсаторних механізмів слизової оболонки стравоходу за умов застосування модифікованих гібридних H ₂ S-NSAIDs.....	52

	17
2.3 Масометричні методи дослідження.....	53
2.4 Морфо-функціональні методи дослідження порушення цілісності слизової оболонки стравоходу.....	53
2.4.1 Макроскопічні дослідження	53
2.4.2 Гістологічні дослідження.....	56
2.5 Дослідження методами молекулярної біології.....	57
2.5.1 Імуноферментні методи дослідження.....	57
2.6 Статистична обробка результатів.....	59
РОЗДІЛ 3 ОСОБЛИВОСТІ БАР'ЄРНОЇ ТА ЗАХИСНОЇ ФУНКЦІЙ СЛИЗОВОЇ СТРАВОХОДУ УМОВ МОДИФІКАЦІЇ ВМІСТУ СІРКОВМІСНИХ СПОЛУК.....	61
3.1 Дослідження впливу ендогенних сірковмісних сполук на захисну та бар'єрну функції епітеліального бар'єру слизової оболонки стравоходу за умов впливу тетрахлорметану та модифікації синтезу ейкозаноїдів дією напроксену та H ₂ S-напроксену (АТВ-346)...	62
3.2 Визначення впливу гіперглікемії та вилучення H ₂ S/CBS і H ₂ S/CSE систем біосинтезу й дії донора сірководню на особливості бар'єрної та захисної функцій епітеліального бар'єру слизової оболонки стравоходу	67
3.3 Дослідження ролі H ₂ S у адаптаційно-компенсаторних реакціях слизової оболонки стравоходу за умов вилучення H ₂ S/CBS і H ₂ S/CSE систем біосинтезу H ₂ S, дії NaHS та у поєднанні зі стрессом	73
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ СІРКОВОДНЮ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ДІЇ УЛЬЦЕРОГЕННИХ ЧИННИКІВ І ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ГІБРИДНИХ СІРКОВМІСНИХ СПОЛУК НАПРОКСЕНУ ТА АЦЕТИЛСАЛЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ.....	82
4.1 Порівняльні дослідження впливу сірководню на бар'єрну функцію та адаптаційно-компенсаторні властивості слизової оболонки стравоходу та місця переходу стравоходу в кардіальну частину	

шлунка за умов медикаментозного езофагіту, індукованого напроксенем та за дії H ₂ S-напроксену.....	83
4.1.1 Макроскопічна та мікроскопічна характеристика цілісності слизової оболонки стравоходу після реалізації впливу пропаргліцину, NaHS, модифікації природнього синтезу ейкозаноїдів і H ₂ S-напроксену	84
4.2 Спрямованість протизапальних реакцій за вмістом інтерлейкіну-6 і цитокіну GCP-2 за умов моделювання NSAIDs-асоційованої езофагопатії та зміни біосинтезу сірководню	91
4.3 Визначення чутливості СОС щурів до розвитку експериментальної NSAIDs-асоційованої езофагопатії за впливу аспірину і H ₂ S- аспірину.....	94
4.4 Дослідження значення сірководню на захисні, адаптаційно- компенсаторні та інтегративні властивості СОС у різні терміни застосування класичної та гібридної H ₂ S-ацетилсаліцилової кислоти	102
РОЗДІЛ 5 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	107
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122
ДОДАТКИ.....	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВІС – водно-іммобілізаційний стрес
ГЕРХ – гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба
ГІУ – гістологічний індекс ураження
ІПП – інгібітори протонної помпи
ЛНМУ – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
НАМН – Національна академія медичних наук
НАН – Національна академія наук
СОС – слизова оболонка стравоходу
СОШ – слизова оболонка шлунка
АSА – ацетилсаліцилова кислота, аспірин
АТВ-340 – H₂S- ацетилсаліцилова кислота, аспірин
АТВ-346 – H₂S-напроксен
СBS – цистатіонін-β-синтаза
СНН – карбоксиметилгідроксиламін геміхлорид
ССl₄ – тетрачлорметан
СОХ – циклооксигеназа
СSE – цистатіонін-γ-ліази
GCP-2 – гранулярний хемотактильний протеїн-2
H₂ – блокатори гістамінових рецепторів
H₂S – Гідроген сульфід (сірководень)
H₂S-NSAIDs – H₂S-нестероїдні протизапальні препарати
H₂S/CBS – система утворення H₂S активністю цистатіонін-β-синтаза
H₂S/CSE – система утворення H₂S активністю цистатіонін-γ-ліази
HSD – висококалорійне високовуглеводне харчування
ІL-6 – інтерлейкін 6
ІL-10 – інтерлейкін 10
ІL-17 – інтерлейкін 17
NaCl – Натрію хлорид
NaHS – Натрію гідрогенсульфід
NO – Нітрогену монооксид
NSAIDs – нестероїдні протизапальні препарати
РАG – пропаргілгліцин

ВСТУП

Актуальність теми

Провідне місце у збереженні цілісності бар'єрної функції стравоходу належить простагландин-залежним і простагландин-незалежним механізмам, порушення яких спричиняє порушення яких спричиняє кислото-асоційовані, коморбідні або ятрогенні захворювання стравоходу, що характеризується хронічним перебігом і рефрактерністю до антацидного лікування [124, 168, 223]. Взаємодія системи циклу арахідонової кислоти з системами газових медіаторів: Гідрогену сульфідру (H_2S), Нітрогену монооксиду та Карбону монооксиду є актуальним напрямом досліджень участі ендогенних медіаторів у різних фізіологічних процесах – регуляції судинного тонуру, роботи мітохондріальної пори, нейротрансмісії, стану системи гемостазу, моторики органів травної системи та ін. [30, 95, 97, 133, 148, 163, 165, 278-285]. 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 обґрунтувати вплив новостворених гібридних сполук – H_2S -асоційованих NSAIDs (H_2S -NSAIDs) [66, 70, 126, 227, 230] 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 пошкоджень 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 пошкоджень 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 (CCl_4), гіперглікемії та модифікації синтезу ейкозаноїдів.

2. З'ясувати вплив модифікації стану систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази, H_2S /цистатіонін- β -синтази (за допомогою інгібіторів синтезу H_2S – пропаргілгліцину, карбоксиметил-гідроксиламін геміхлориду та донора H_2S – натрій гідрогенсульфіду), модифікації біосинтезу ейкозаноїдів і застосування H_2S -асоційованого напроксену на бар'єрну функцію стравоходу і прояви протизапальних реакцій.

3. Визначити роль H_2S у фізіологічних захисних та адаптаційно-

компенсаторних механізмах слизової оболонки стравоходу за умов моделювання стрес-індукованих пошкоджень і за гальмування активності системи H_2S /цистатіонін- γ -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 H_2S .

5. Оцінити зв'язок між чутливістю слизової оболонки стравоходу до впливу улцерогенних чинників і прозапальними реакціями після введення класичного й гібридного H_2S -асоційованого напроксену і H_2S -асоційованого аспірину в різні терміни застосування.

Об'єкт дослідження – фізіологічні механізми захисних та адаптаційно-компенсаторних реакцій слизової оболонки стравоходу щурів за умов улцерогенних пошкоджень зміною каталітичної активності біосинтезу H_2S .

Предмет дослідження – структурно-функціональні особливості стану бар'єрної і захисної функцій стравоходу; протизапальна активність цитокін-чутливих сигнальних шляхів за умов норми, модифікування біосинтезу H_2S , ейкозаноїдів і застосування H_2S -NSAIDs.

Методи дослідження: фізіологічні – моделювання цитолітичних пошкоджень СОС співвідносних з ознаками неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії; біохімічні – блокування активності цистатіонін- γ -ліази (CSE) і цистатіонін- β -синтази (CBS), застосуванням сполук донорів сірководню: NaHS, H_2S -напроксену, H_2S -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 H_2S /цистатіонін- γ -ліази та H_2S /цистатіонін- β -синтази призводять до руйнування бар'єрної та

захисної функції СОС. Доведено цитопротекторну роль H_2S та можливість моделювання неерозивного езофагіту за рахунок гальмування систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази, H_2S /цистатіонін- β -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 H_2S в адаптаційно-компенсаторних механізмах бар'єрної та захисної функцій стравоходу, секретії 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- γ -ліази (CSE) та H_2S /цистатіонін- β -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 9th Annual Scientific conferences, RECOOP, Split (2014); 18th 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); 15th International Conference of Ulcer Research, Ottawa (2015); RECOOP 6th TriNet Meeting, Prague, RECOOP (2015);. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference RECOOP, Prague, (2016); Cedars-Sinai Medical Center & RECOOP. Bridges in Life Sciences Annual Conference, Budapest (2017); 2nd Regional Congress of Physiological Societies and 4th Congress of Croatian Physiological Society, Dubrovnik (2017); 8th 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Особливості фізіологічних механізмів цитопротекції та ульцерогенезу в стравоході

Слизова оболонка стравоходу зберігає свою цілісність завдяки унікальній бар'єрній функції, що залежить від взаємодії місцевих та системних впливів [41,142, 202], опірності до ульцерогенних чинників і співвідносна з функціональним адаптаційно-компенсаторним потенціалом клітинних і субклітинних структур [44, 169, 181, 277] та захисними властивостями преепітеліального, епітеліального та сполучнотканинного компонентів до дії пошкоджувальних чинників хімічного (напр., дія кислотного чи лужного шлункового вмісту, ліків), механічного (напр., вплив харчової грудки різної консистенції під час ковтання, порушення моторики), фізичного (напр., вплив іонізуючої радіації) та біологічного (напр., адгезії потенційних патогенних вірусних і бактеріальних та інших токсинів) характеру [35, 53, 58, 84, 105, 183, 206]. Порушення рівноваги між цитоагресивними та цитопротекторними факторами може стати важливим тригером для руйнування цілісності СОС та порушень моторно-евакуаторної функції стравоходу, що маніфестується езофагітом [11, 13, 37, 42, 57, 58, 194]. Доказано, що неерозивний езофагіт є основою для розвитку неерозивної рефлюксної хвороби (НЕРХ), гастроєзофагеальної рефлюксної хвороби (ГЕРХ), що має різноманітні варіанти, включно з ендоскопічно «негативними» формами та екстраезофагальними нозологіями, а також стравоходом Баррета, езофагопатіями, асоційованими або коморбідними (від англ.: comorbid conditions) з цукровим діабетом, ожирінням, ревматичними (системною склеродермією, червоним системним вовчаком,

дермоміозитом, ревматоїдним артритом) та імунологічними захворюваннями [12, 33, 41, 67, 72, 78, 138, 151, 197].

Дослідженнями експериментальної та клінічної гастроентерології виявлено також, що езофагіт також розвивається на тлі гіперчутливості до ліків, внутрішніх захворювань, що потребують тривалого лікування [81, 149, 155, 179, 186], токсичної корозивної дії (калій хлориду, хінідину, бісфосфонатів), зміни локальної осмолярності, кислотно-лужної рівноваги (напр., за застосування Ферум сульфату), під час приймання дигідропіридинів, антихолінергічних, що сприяють дисфункції нижнього стравохідного сфінктеру та інших засобів [44, 45, 102, 120, 147, 266]. Зміни природного синтезу простагландинів, що виникають внаслідок залучення циклу арахідонової кислоти після неселективного блокування циклооксигеназ (англ.: cyclooxygenase, COX), у найбільшій мірі активності COX-1, маніфестуються порушеннями природних ендогенних цитопротекторних механізмів епітеліального бар'єру та моторно-евакуаторної функції стравоходу [159, 167, 171, 220, 277]. Було доведено, що COX-1 і COX-2 і ліпоксигеназа (англ.: lipoxygenase, LOX) 5-LOX та їх похідні простагландини і лейкотрієни відіграють не тільки важливу участь у регуляції захисних процесів, запалення, а також у процесах аутофагії, виживання та апоптозу клітин СОС [1, 74, 92, 234]. Більше того, H_2S взаємодіє з газовими медіаторами Нітроген монооксидом (NO), та Карбон монооксидом (CO), які за даними літератури є важливими сигнальними молекулами для міжклітинної взаємодії та внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [22, 26, 263, 264, 274].

Крім того, експресія сіало-, манозо- та фукозоспецифічних рецепторів у слизовій оболонці стравоходу за умов експериментального езофагіту у різних моделях ульцерогенного впливу вказує на важливість цих біомаркерів для оцінювання проявів запалення, показуючи виразне домінування змін у субепітеліальних структурах (стромі), а саме збільшення ендотеліальної проникливості та дезорганізації м'язової пластинки, що може впливати на

захисні властивості слизового бар'єра [30, 105, 111, 124]. Показано, що особливості специфічної експресії рецепторів сіалоспецифічних і манозоспецифічних глікокон'югатів у мікросудинах є ознакою ендотеліальної дисфункції, фукозоспецифічних – у нервових клітинах і м'язовій пластинці, що дозволяє їх використовувати у якості біомаркерів для цитопротекторних властивостей стравоходу [293, 294]. Процеси сіалізації та сульфатування, які відбуваються в олігосахаридах муцинів слизу в преепітеліальному компоненті СОС забезпечують додаткову протидію цитолітичному впливу, залучаючи відповідні сигнальні шляхи, що визначають стійкість бар'єрної і захисної функцій [289, 294]. Нашими попередніми дослідженнями встановлено цитопротекторний, протизапальний та виразкозагоювальний характер впливу мелатоніну та L-триптофану на морфо-функціональну реорганізацію епітеліального бар'єру стравоходу за умов розвитку стрес-асоційованого ульцерогенезу, що супроводжувався ознаками активування NO-ергічної системи, зміною синтезу вмісту ендогенних PG, IL-1 β , IL-8, TNF α , VEGF та інтенсифікацією процесів ліпопероксидації [111, 289, 293, 294].

Отже, все більше доказів підтверджують важливість вазотропних реакцій у цитопротекції СОС та вказують на виняткову роль бар'єрної функції стравоходу в підтриманні нормального стану стравоходу та розвитку захворювань. Як результат, саме поява ендотеліальної дисфункції може відігравати важливу роль в патогенезі ГЕРХ і НЕРХ [23, 26, 45, 86, 123, 141]. Більше того, враховуючи патогенетичний зв'язок стравоходу Барретта з перебігом хронічної ГЕРХ і НЕРХ та дані епідеміологічних спостережень, що у 25% випадків стравоходу Барретта у пацієнтів відсутні ознаки рефлюксу і присутня так звана «німа» форма (в англ.: silent type) НЕРХ, яку згідно рекомендацій Міжнародної наукової групи експертів-гастроентерологів про оновлення Лос-Анджелівської класифікації ендоскопічних проявів ГЕРХ, потрібно класифікувати як М – мінімальний езофагіт або N – за відсутності макроскопічних змін [36, 91, 175, 202],

актуальним завданням є дослідження чинників модуляції молекулярних механізмів бар'єрної функції СОС. Саме тому, необхідно ретельно в експериментальних дослідженнях вивчати вплив чинників, що забезпечують вазотропний компонент езофагопротекції [55, 79-81]. Таким чином, враховуючи зростання поширеності НЕРХ, GERX, можливість малігнізації стравоходу Барретта, збільшення кількості пацієнтів молодого працездатного віку з такою патологією, важливим завданням експериментальної гастроентерології є опрацювання нових моделей порушення бар'єрної функції стравоходу на тваринах [83, 93, 102, 199, 209, 225], оскільки це б дозволило більш детально з'ясувати механізми появи преульцерогенних змін у СОС в аспекті доказової медицини та відшукати фізіологічно обґрунтовані терапевтичні засоби.

Нещодавні дослідження показали, що консенсусні положення узгоджувальної комісії з оптимізації лікування хворих на GERX (Нью-Хейвен, 1997), Монреальські рекомендації (2005 р.), Гштадські рекомендації (2009 р.) щодо пацієнтів з езофагітами та їх лікувальні схеми з потужними препаратами, що блокують шлункову секрецію, та прокінетиками потрібно переглянути [42, 81]. Досліджено, що тривале або постійне приймання таких засобів має побічну дію, як гіпергастринемія, порушення мікробіоценозу, зниження ензимної активності шлункового соку [20, 116]. Саме тому, важливими принципами терапії для лікування захворювань стравоходу повинні стати фізіологічно обґрунтовані засоби і способи, що забезпечать активування природної езофагопротекції [118, 133, 223, 282].

1.2 Роль газового медіатора гідроген сульфід (H₂S) у бар'єрній та захисній функціях епітеліального бар'єру органів травної системи

Дослідження фізіологічних властивостей впливу H₂S, що можуть мати саногенну або високотоксичну небезпечну дію на організм людини розпочались з часів прадавньої медицини, проте в останні два десятиліття

набули особливої актуальності, оскільки H_2S було визнано новим газовим медіатором (синонім – трансмітером), що разом з іншими газовими медіаторами NO та CO, виявляє плейотропну дію [95, 108, 128, 178, 196]. Концепція міжклітинної взаємодії за допомогою H_2S та з'ясування його біодоступності та дії на організм були вперше представлені в початку 20-го століття (табл.1.1) [133, 134, 174, 198].

Таблиця 1.1

Найбільш знакові публікації про значення H_2S в біомедицині.

№	Автори	Назва	Бібліографія, IF (кількість цитувань)
1	Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R.	The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener	EMBO Journal 1 Nov 2001; 20(21):6008–6016. IF=9.792 (1414)
2	Wang R	Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter?	FASEB Journal Nov 2002; 16(13):1792–1798. IF=5.498 (1348)
3	Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K., Meng Q., Mustafa A.K., Mu W., Zhang S., Snyder S.H., Wang R.	H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine-lyase	Science 24 Oct 2008; 322(5901):587–590. IF=37.205 (1254)
4	Wang R.	Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed	Physiological Reviews Apr 2012; 92(2):791–896. IF=27.312 (634)
5	Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL.	Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H_2S): development of H_2S -releasing drugs as pharmaceuticals.	Journal of Medicinal Chemistry. 2010 May 12; 53(17):6275-86. IF=6.259 (198)

З того часу розпочалося бурхливе вивчення H_2S в аспекті фундаментальних та прикладних досліджень у різних галузях біології та медицини, встановлено шляхи його біосинтезу та біодоступність (вільний, зв'язаний та сульфат-сульфур), що залежить від швидкості його утворення, метаболізму та кількості полі- та персульфідів, зв'язаних з білками [85, 87, 177].

Метаболізм сірководню нерозривно пов'язаний з обміном сірковмісних сполук. Основними джерелами сульфуру в людському організмі є сірковмісні амінокислоти – цистеїн, гомоцистеїн, таурин, метіонін та їхні похідні (рис. 1.1 а-в), деякі вітаміноподібні сполуки, наприклад, ліпоєва кислота та інші. Добре відомо про потужні сірковмісні властивості деяких рослин, напр., вміст алліцину в часнику (рис.1.1 г) та їхню потенційну цитопротекторну роль [108, 113, 269].

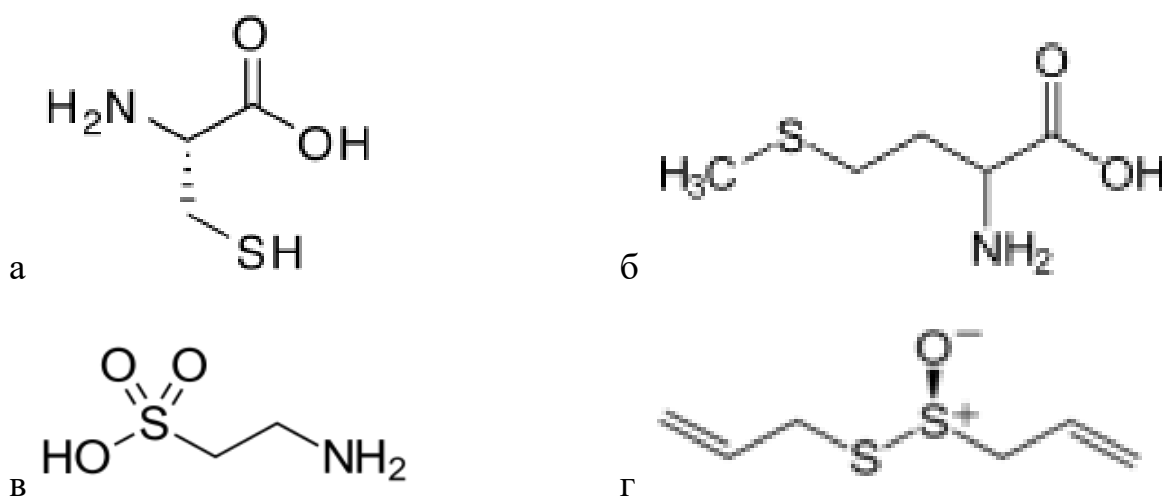


Рис. 1.1. Органічні сірковмісні сполуки: (*R*)-цистеїн, амінокислота, що містить тіольну групу (а), метіонін, амінокислота, що містить тіоетерну групу (б), таурин, похідна сульфуркислота цистеїну (в), аліцин, активний компонент часнику (г)

Про вагоме значення досліджень, присвячених H_2S та пошук сфери їх застосування у клінічній медицині та фармакології, свідчать матеріали чотирьох міжнародних конференцій з біології та медицини, присвячені H_2S ,

що відбулись в Шанхаї (Китай, 2009 р.), Атланті, штат Джорджія (США, 2012 р.), Кіото (Японія, 2014 р.) та Неаполі (Італія, 2016 р.), а також факт планування п'ятої міжнародної конференції в Торонто (Канада) в 2018 р.

Численні дослідження в Україні та у всьому світі довели важливу роль H_2S як нейротрансміттера, медіатора спрямованості судинних реакцій (залучаючи K^+ _{АТР}-канали та взаємодіючи з NO через активування системи Ca^{2+} -кальмодуліну), ангіокринного активатора секреції (ендотеліальних вазоактивних речовин), адгезії тромбоцитів, експресії про- та протизапальних хемокінів, хемотаксисі імунних клітин та вивільненні ними активних форм кисню і цитокінів, нейтралізації вільнорадикальних цитотоксичних сполук та аутофагії [133, 134, 136, 148, 198, 268, 282-285].

Оскільки, для протидії оксидативному стресу організм має потужний антирадикальний ресурс, H_2S бере участь у регулюванні внутрішньоклітинного редокс-статусу, а також сигнальних каскадів фосфорилування, апоптозу, залучаючи мітохондріальні K^+ _{АТР}-канали [9, 88, 109, 174]. Свій вплив H_2S реалізує через збільшення активності системи глутатіону (GSH, GSR, GPx), експресії рецепторів TLR4 (англ.: toll-like receptor 4) та опосередковано впливає на ядерний фактор-каппа В (англ.: nuclear factor-kappa B, NFκB) і регулювання транскрипції прозапальних генів [68-75, 82, 113, 126]. У дослідженнях *in vitro*, *in vivo* отримано докази про гальмівний вплив H_2S на вивільнення IL-1β, IL-8, TNFα, NF-κB [133, 185, 193].

Бібліометричні дослідження за допомогою Google Scholar виявляють понад 20000 публікацій, в яких досліджено фізіологічну роль гідроген сульфіду, як газового медіатора у процесах цитопротекції, ноціцепції в слизовій оболонці шлунка і товстої кишки та його взаємодії з низькомолекулярними метаболітами інтестинального мікробіому [21, 95, 133, 157, 165-167, 182, 208, 238, 239, 252], а також у аспекті функціонування сульфатвідновлювальних бактерій та їх значення у розвитку захворювань [20]. Більше того, встановлено, що гальмування H_2S /CBS системи утворення

сірководню спричиняє збільшення проникливості судин, зменшення ролінг-швидкості лейкоцитів (англ.: rolling-velocity) та активності COX-2, і збільшення прозапальних проявів та сповільнення загоєння [29, 32, 140, 166, 185, 187, 216]. Нещодавно встановлено, що застосування донорів біосинтезу H_2S (натрій гідрогенсульфіду, NaHS, диалліл дисульфід, DADS) сприяє зменшенню проявів альтерації, запальних та дистрофічних змін у слизовій оболонці та дисбіозу [135, 247, 250, 257, 261, 270].

Незважаючи на велику кількість публікацій, пов'язаних із дослідженням ролі H_2S в травній системі, систематичний аналіз наукової літератури досліджень впливу H_2S на функціонування стравоходу вказує на вивчення його впливу, як сигнальної молекули у молекулярних механізмах, що через L-тип кальцієвих каналів може змінювати функціонування нижнього стравохідного сфінктера, моторно-евакуаторну діяльність, що забезпечує рух харчової грудки через стравохід, та у формування ахалазії [182, 296]. Використовуючи загальнодоступну літературу та літературні наукові бази даних Web, ми з'ясували, що стан бар'єрної функції та захисних реакцій СОС за умов різної активності H_2S та впливу дії ульцерогенних чинників попередньо не досліджувався.

1.3 Фізіологічні механізми розвитку медикаментозної езофагопатії

Одними з важливих хвороб стравоходу, до яких сьогодні привернута увага світової медичної спільноти є медикаментозні (ятрогенні) езофагопатії, що виникають унаслідок застосування лікувальних препаратів (антибактеріальних, глюкокортикостероїдів, цитостатиків, антагоністів кальцію (блокаторів кальцієвих каналів), спазмолітиків, анальгетиків, цитостатиків, антитромбоцитарних та протизапальних нестероїдних засобів та інших) [1, 19, 43, 179, 242, 265, 266]. Для таких захворювань характерний хронічний перебіг, рефрактерність до лікування та ознаки неерозивного або ерозивного езофагіту, що часто спричиняють

появу стриктур [162, 169, 240]. Найчастіше медикаментозні езофагопатії виникають на тлі імунодефіцитів [149, 150, 153, 172] та лікування NSAIDs – одних з найбільш широко вживаних лікарських засобів з огляду на протизапальну, знеболювальну, жарознижувальну і антиагрегантну дії для профілактики й лікування запальних захворювань, артритів, колагенозів, больового синдрому, лихоманки та ішемічних серцево-судинних та церебро-васкулярних захворювань [74, 90, 245]. Серед NSAIDs найпоширенішим засобом є ацетилсаліцилова кислоти (від англ.: acetylsalicylic acid, ASA), що добре відома як препарат аспірин, з широкими показами для призначення та побічним деструктивним впливом на бар'єрну функцію органів травної системи [7, 100, 127, 139, 156, 165]. До нещодавно вважалося, що ASA достатньо ефективний і соціально-економічно вигідний засіб для медикаментозної профілактики вікових змін у системі кровообігу та ускладнень серцево-судинних захворювань [129, 161], однак потужна побічна геморагічна обмежує його застосування. Також було встановлено ефективність NSAIDs для запобігання порушень проліферації, розвитку пухлин молочної залози, стравоходу Барретта, трансформації його в аденокарциному стравоходу, а також колоректальний рак [156, 167, 203], що обумовлено їхнім впливом на експресію COX-2, проліферацію та апоптоз [167, 168]. Свої антипроліферативні властивості NSAIDs реалізують шляхом регуляції активності EGF (епідермального фактора росту), bFGF (фактора росту фібробластів), плейотропних факторів транскрипції NF-κB (ядерного фактора κB), сурвівіна і Flt-1 (FSM-пов'язаної тирозин-кінази 1). Протиракові властивості препаратів, що належать до NSAIDs ґрунтуються на здатності пригнічувати клітинний поділ та індукувати апоптоз в культурах клітин аденокарциноми стравоходу, колоректальних неоплазій та пригнічувати ангиогенез пухлини [192, 272].

Однак, не дивлячись на прогрес в науці у створенні новітніх селективної дії NSAIDs, їхнє застосування достатньо часто супроводжується побічною дією,

що найбільш часто виникає не лише з боку травної системи, а також серцево-судинної [5, 11, 14, 30, 115, 245]. Особливо небезпечними такі ускладнення є для осіб з високою сприйнятливістю до цитоагресивної дії циклооксигенази-2 і ліпооксигеназ, пацієнтів похилого віку (після 60 років) або тих, хто раніше хворів на кислото-асоційовані хвороби, а також коли поєднують призначення NSAIDs з кортикостероїдними препаратами, або антикоагулянтами, або комбінування двох NSAIDs (наприклад, аспірину і напроксену) [49, 127, 156]. До проявів ускладнень NSAIDs належать життєво небезпечні стани, як поява ерозивно-геморагічних пошкоджень у слизовій проксимального та дистального відділів травної системи, що можуть мати гострий та хронічний перебіг [10, 101, 127, 253]. Більше того, застосування інгібіторів протонної помпи (ІПП) або інших антисекреторних засобів (наприклад, блокаторів гістамінових рецепторів, як H₂-блокаторів) для попередження NSAIDs-індукованих уражень епітеліального бар'єра викликає протилежний ефект [47, 145, 155]. Відомо, що якщо поєднувати ІПП або H₂-блокатори з NSAIDs, то посилюється пошкодження СОС та слизової оболонки шлунка (СОШ), порушується функціонування сфінктерного апарата та моторної активності у травній системі, ентеро-саліваторна рециркуляція нітритів, розвивається дисбіоз, гіпергастринемія, що є передумовами для онкогенезу [30, 254].

Настільки ж істотну проблему представляє використання низьких доз ASA як антитромбічної терапії, яка до нещодавно вважалася досить ефективним і при цьому найдешевшим засобом профілактики вікових змін і виникнення захворювань серцево-судинної системи [100, 212].

До останнього часу побічна дія NSAIDs на бар'єрну функцію органів травлення у проксимальному відділі травної системи досліджувалася переважно тільки в ділянці шлунку та дванадцятипалої кишки.

Проблемі «NSAIDs-індукованих пошкоджень стравоходу» і «NSAIDs-езофагопатій» присвячені численні клінічні спостереження, проте існує недооцінка її наукової значущості та необхідність у зміні стереотипів у сприйнятті цієї проблеми з огляду на глобальну тенденцію постаріння

населення внаслідок збільшення тривалості та покращення якості життя, розвитку вік-залежної патології та застосування медичних реконструктивних технологій (кардіо-хірургічних, ортопедичних, стоматологічних тощо), що вимагають тривалого приймання NSAIDs [5, 12, 14, 17, 43, 52, 106, 137]. Саме тому стає актуальним опрацювання в експериментальній гастроентерології моделей NSAIDs-езофагопатій на тваринах та розробка адекватних засобів, спроможних корегувати ульцерогенну дію NSAIDs, що дозволить вивчати як механізми природних захисних реакцій СОС, так і сприятиме створенню нових безпечних аналогів [251, 255, 259, 269].

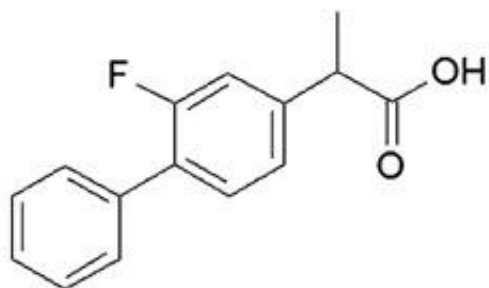
1.4. Сучасний стан проблеми розробки фізіологічно-обґрунтованих езофагопротекторних засобів та засади їх створення

В останні 10 років під час експериментальних та клінічних досліджень виявлено, що хронічний характер неерозивних пошкоджень СОС супроводжується проявами хронічного (млявого) запалення (в англ.: low grade inflammation), схильністю до появи рецидивів і рефрактерністю до лікування [124]. Більше того, встановлено, що всі ці фактори відіграють ключову роль у трансформації езофагіту в стравохід Барретта [119, 203]. Водночас нещодавно доведено ефективність застосування NSAIDs для запобігання ризиків розвитку аденокарциноми стравоходу та колоректального раку [110, 200, 211], однак їхня побічна цитодеструктивна дія обмежує впровадження такого нового способу профілактики [4]. Отже, пошук безпечних сполук таргетної дії з протизапальною та антипроліферативною діями для профілактики малігнізації клітин набуває особливої ваги з огляду на соціально-медичне значення проблеми. Привертає увагу розробка та впровадження новаторських засобів, які відомі як «smart drugs» (дослівно з англ.: «розумні ліки») і володіють ефективною дією основного «батьківського» засобу і властивістю індукувати фізіологічні захисні реакції, що можуть істотно знизити цитодеструктивну дію і зменшити негативні побічні ефекти. З огляду на такі обставини раціональним

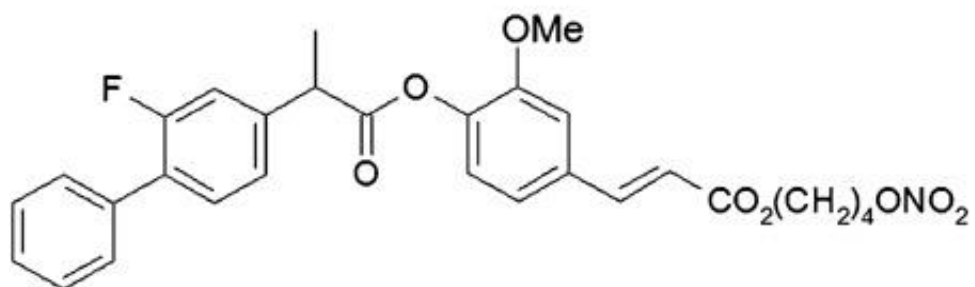
буде створення сполук, так званих гібридних молекул, що містять 2 структурних домена з відмінними ефектами, та досліджувати їх як засоби, що матимуть подвійний механізм дії [117].

Враховуючи, що важливу роль у індукції запалення мають природні газові медіатори [133, 134, 196], а інтенсивне вивчення функціонального значення NO і H₂S, їхніх каталітичних біорегуляторів та взаємодії NO-H₂S і циклу арахідонової кислоти, показало, що вони є ключовими у спрямованості змін стосовно проникливості судин і у формуванні так званого гемодилуційного слизового бар'єра органів системи травлення [238, 239, 267, 274], важливим є дослідження і фізіологічне обґрунтування застосування засобів, що мають протизапальну дію.

З даних літератури відомо, що завдяки вазопротекторним ефектам NO і H₂S можна запобігти побічній дії NSAIDs та інших поширених лікувальних препаратів, що викликають ерозивно-виразкові пошкодження епітеліального бар'єра органів травної системи, про що свідчать результати застосування NO- і H₂S-збагачених засобів (наприклад, NO-аспірин, S-аспірин, NOSH-аспірин, NCX2216 (рис. 1.2) і S-диклофенак (рис.1.3) чи АТВ 337) [139, 165, 189].

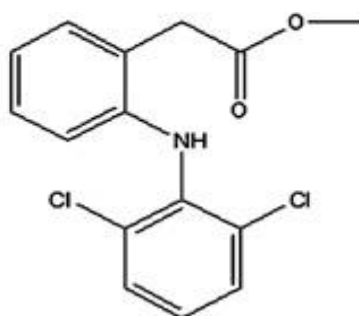


Flurbiprofen

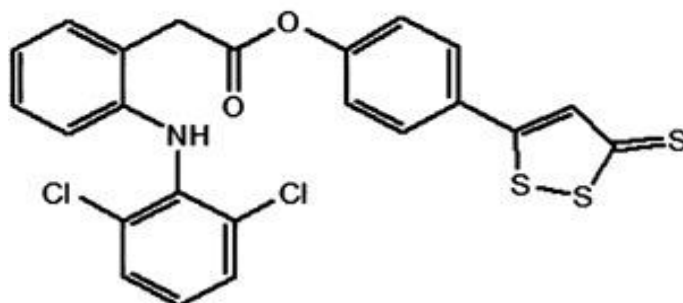


NCX 2216

Рис. 1.2. Флюгбіпрофен (flurbiprofen, класичний NSAID) NO-збагачений дериват флюгбіпрофену (NCX-2216)



Diclofenac



ATB-337

Рис. 1.3. Диклофенак (diclofenac, класичний NSAID) і H₂S -збагачений дериват диклофенаку (ATB-337)

Оскільки, засоби збагачені NO не отримали широкого поширення у клінічній практиці через їх побічну дію на серцево-судинну систему, тому актуальним напрямком стає селективна оптимізація побічних ефектів за умов активування фізіологічно обґрунтованих механізмів, що нівелюють цитоагресивний вплив. Таким чином, дослідження впливу H₂S-похідних сполук мають широку перспективу у біомедичних дослідженнях та створенні нових засобів у контексті концепції «розумних ліків» [25, 126].

Упродовж останніх 15 років розроблено сполуки H₂S-похідних NSAIDs (H₂S-NSAIDs), що володіють антигіпертензивною, вазодилітаторною, антитромбозною та протираковою діями [261, 269-274]. Науковий доробок наукової групи J.L.Wallace підтвердив ефективність застосування H₂S-диклофенаку і АТВ-346 (H₂S-напроксену) для лікування експериментального артриту [77, 248, 249], дію АТВ-429 (H₂S-месаламіну) – неспецифічного виразкового коліту та хвороби Крона [66, 245, 248, 250, 257-258, 260].

Отже, все більше доказів підтверджують доцільність використання нових фізіологічно обґрунтованих сполук, дія яких сприятиме збільшенню вмісту ендogenous газowego медіатора H₂S. Дослідження ефективності гібридних H₂S-NSAIDs у порівняльних дослідженнях з класичними NSAIDs (напр., напроксен й аспірин) на цілісність епітеліального бар'єра стравоходу допоможе з'ясувати дію сірководню у механізмах цитопротекції.

Узагальнюючи наведені літературні дані, на сьогодні достеменно відомо, що в основі розвитку патологій стравоходу ГЕРХ, НЕРХ, медикаментозної езофагопатії є порушення бар'єрної та захисної функцій стравоходу, що підвищують чутливість СОС до дії ульцерогенних чинників. H₂S відіграє ключову роль у формуванні бар'єрної функції стравоходу та є об'єднувальною ланкою між вазотропним та епітеліальним її компонентами, забезпечуючи активування протизапальних реакцій. Однак, на даний час не досліджено чи може модифікація синтезу ендogenous сірководню вплинути на чутливість СОС до дії ульцерогенних чинників, а також чи можливо використати такий ефект у розробці експериментальної моделі неерозивного

езофагіту на тваринах, які були б співвідносними з ознаками патології що розвивається у людини.

Вивчення гібридних сполук H_2S -похідних, що водночас володіють потужною протизапальною дією і можуть нівелювати цитотоксичний вплив активності COX-2 та/або вільнорадикальних сполук у аспекті езофагопротекторного впливу у доступній нам науковій літературі не проводилось. Саме тому, необхідно з'ясувати дію гібридних сполук H_2S -похідних на цілісність СОС за умов пошкоджувального впливу нестероїдних протизапальних препаратів. Відповідям на поставлені питання була присвячена дисертаційна робота.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт, етапи та умови дослідження

Дослідження проводились на білих нелінійних лабораторних щурах-самцях, віком 4-6 місяців, масою 170-220 г (n=139), згідно Закону України, нормативами Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 р.) та Хельсинської декларації Всесвітньої Медичної асоціації (1996 р.), ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародними угодами та національним законодавством у цій галузі, та дозволу комісії з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 24 лютого 2014 р.).

Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію з дотриманням стандартного харчового раціону та вільним доступом до води. У серії експериментів для моделювання висококалорійного харчування використовували раціон з високим вмістом вуглеводів, коли щурі мали вільний доступ до 30% розчину фруктози (Козар В.В., 2008) [143]. У якості контрольного препарату (плацебо) застосовували стерильний 0,9% розчин NaCl.

Кількість тварин, використаних у кожній експериментальній серії, вказана в дужках після підписів під відповідними рисунками. Для виведення щурів з експерименту застосовували внутрішньоочеревинне (в/о) введення тіопенталу натрію (Україна), з розрахунку 60 мг/кг^{-1} маси тіла.

На основі поставленої мети та окреслених завдань були проведені наступні серії досліджень для вивчення ролі H_2S у бар'єрній функції стравоходу, механізмах цитопротекції та адаптаційно-компенсаторних реакціях слизової стравоходу шляхом моделювання неерозивного езофагіту цитолітичною токсичною дією тетрахлорметану, гіперглікемії, блокуванням біосинтезу H_2S внаслідок вилучення чи зміни каталітичної активності V_6 -залежних ензимів:

цистатіонін- γ -ліази (CSE, КФ 4.4.1.1), цистатіонін- β -синтази (CBS, КФ 4.2.1.22) [97, 99, 114, 216], активності COX, застосуванням натрій гідрогенсульфіду (NaHS), що збільшує вивільнення H_2S , модифікацією біосинтезу ейкозаноїдів, та дослідженням класичних і гібридних сірководневих похідних нестероїдних протизапальних препаратів: напроксену і аспірину та сполук H_2S -напроксену (рис. 2.1) і H_2S -аспірину (рис. 2.2) [164, 165, 258] в умовах разового або тривалого введення та у поєднанні з індукцією гострого стресу [10, 215, 236, 237].

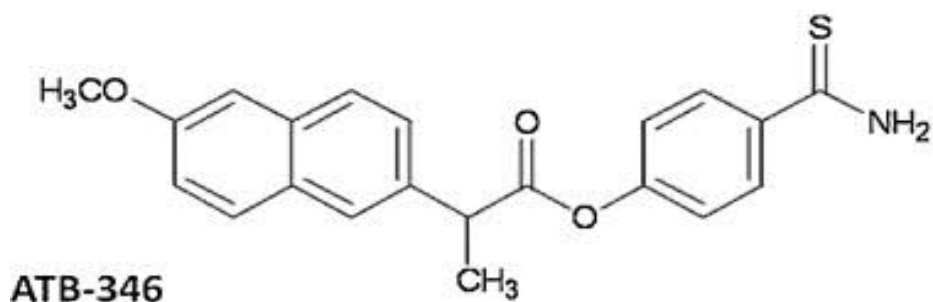


Рис. 2.1. Хімічна будова H_2S -напроксену (АТВ 346)

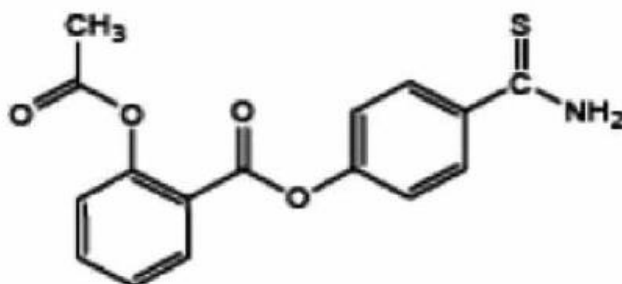


Рис. 2.2. Хімічна будова H_2S -аспірину (АТВ 340)

Для досягнення поставленої мети та вирішення завдань, робота була нами розділена на 3 основні етапи (табл. 2.1):

I етап досліджень був спрямований на дослідження бар'єрної функції стравоходу під час індукції пошкодження СОС на тваринах цитолітичним впливом CCl_4 , включаючи блокування внутрішньоклітинних сірковмісних сполук N-ацетилцистеїну та L-цистеїну [73, 82, 213], моделювання пре-метаболичного синдрому 28-денним гіперкалорійним високовуглеводним

харчуванням за Козар В.В., 2008 (HSD, від англ.: high sugar diet) [143, 180, 243] з одночасним моделюванням біосинтезу H_2S у наслідок змін каталітичної активності ензимів: CSE, вводячи пропаргілгліцин (PAG) у разовій дозі 25 мг/кг, в/о, та CBS, вводячи карбоксиметил-гідроксиламінгеміхлориду (СНН) вводячи у дозі СНН на 3 ммоль/кг/добу, в/о, а також застосовуючи донор H_2S -неорганічну сіль натрію гідрогенсульфіду (NaHS) у разовій дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о.

II етап досліджень був присвячений з'ясуванню особливостей бар'єрної функції СОС за умов модифікування ендogenous синтезу H_2S , ейкозаноїдів та в поєднанні з індукцією ВІС, що застосовували для вивчення адаптаційно-компенсаторних реакцій стравоходу під час спотворення природної біодоступності сірководню. Для цього в серійних дослідженнях використовували напроксен – 30 мг/кг/добу, *per os*, 9 днів і H_2S -напроксен – 14,5 мг/кг/добу, *per os*, також інгібітори системи утворення сірководню H_2S /CSE– PAG (у разовій дозі 25 мг/кг/добу, в/о) і H_2S /CBS системи – СНН (у разовій дозі 3 ммоль/кг/добу, в/о), і неорганічний донор H_2S – NaHS (у разовій дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о), без та у поєднанні з індукцією гострого стресу [236, 237].

III етап включав у себе дослідження H_2S -залежних змін бар'єрної функції та адаптаційно-компенсаторних властивостей СОС у моделі зміни природної активності циклооксигеназ та синтезу простагландинів класичним NSAIDs ацетилсаліциловою кислотою (10 мг/кг/добу, *per os*), та за умов застосування гібридної сполуки H_2S -NSAIDs H_2S -аспірину (АТВ-340) у дозі 17,5 мг/кг/добу, *per os*. Усі речовини NSAIDs вводили разово та впродовж 9-х днів, без та у поєднанні з індукції гострого стресу.

Дози введення PAG, СНН, NaHS, H_2S -напроксену (АТВ-346), H_2S -аспірину (АТВ-340) здійснено за Wallace J.L. et al., 2012-2017.

Групи тварин утримували на стандартних умовах, в індивідуальних клітках чи клітках Боллмана для попередження копрофагії. Для визначення досліджуваних параметрів у дослід бралася кількість тварин, яка забезпечувала статистично достовірні результати. Експериментальні групи

тварин включали 4-6 осіб кожна і формувались за вихідною масою тіла. У всіх експериментах формували групу контрольних тварин, яким у якості контрольного препарату (плацебо) застосовували стерильний 0,9% розчин NaCl. Отримані під час експериментів параметри порівнювали, як з результатами контрольних груп, так і з величинами показників тварин, яким застосовували введення засобів для зміни природної відповіді, а також з результатами досліджуваних тварин без введення засобів.

Відомості про етапи досліджень, кількість тварин, використаних в кожній серії експериментів, спосіб індукції ушкодження та умови використання різних засобів наведено в табл. 2.1. Спосіб введення та дози препаратів, а також тривалість досліджень наведено під час викладення матеріалу.

Таблиця 2.1

Головні етапи дослідження

N з/п	Етап дослідження	Групи піддослідних тварин	n, N
1	2	3	4
1	Дослідження ролі H ₂ S у бар'єрній функції стравоходу на моделях неерозивного езофагіту після введення: 1) CCl ₄ в дозі 0,3 мл/200 г/маси тіла двічі на добу у формі суспензії з соняшниковою олією <i>per os</i> (в якості плацебо 1,0 мл 0,9% NaCl, в/о) без та з блокуванням активності циклооксигенази (COX) напроксеном у дозі 30 мг/кг/добу, в/о та застосуванням H ₂ S-асоційованого напроксену (H ₂ S-напроксен, АТВ 346) у дозі 43,5 мг/кг/добу, в/о.	1. контрольна (інтактні, з плацебо, в/о) 2. тип ураження СОС дією CCl ₄ + плацебо, в/о 3. тип ураження СОС дією CCl ₄ + напроксен, в/о 4. тип ураження СОС дією CCl ₄ + H ₂ S-напроксен, в/о	5 5 5 5 N=20

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4
	<p>2) застосування гіперкалорійного високовуглеводного харчування (HSD) з гальмуванням активності H_2S/CSE системи біосинтезу H_2S, застосовуючи PAG у разовій дозі 25 мг/кг/добу, в/о; активності H_2S/CBS системи, застосовуючи СНН у разовій дозі 3 ммоль/кг/добу, в/о, та натрій гідрогенсульфід (NaHS) у разовій дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о</p>	<p>1. контрольна група (HSD з плацебо, в/о) 2. тип ураження СОС дією HSD + дія PAG, в/о 3. тип ураження СОС дією HSD + СНН, в/о 4. тип ураження СОС дією HSD + NaHS, в/о</p>	<p>6 6 6 6 N=24</p>
2	<p>З'ясування ролі H_2S на бар'єрну функцію та адаптаційно-компенсаторні реакції СОС за умов:</p> <p>1) модифікування синтезу H_2S гальмуванням активності H_2S/CSE системи – PAG (у разовій дозі 25 мг/кг/добу, в/о) і активності H_2S/CBS системи – СНН (у разовій дозі 3 ммоль/кг/добу, в/о), а також стимулювання біосинтезу H_2S – NaHS (у разовій дозі 100 мкмоль/кг/добу, в/о) та поєднанням з індукцією стресу;</p> <p>2) під час модифікації синтезу ейкозаноїдів шляхом блокування активності COX введенням напроксену (30</p>	<p>1. контрольна (плацебо, в/о) 2. моделювання біосинтезу H_2S дією PAG, в/о 3. моделювання біосинтезу H_2S дією СНН, в/о 4. моделювання біосинтезу H_2S NaHS, в/о 5. індукція ВІС + плацебо, в/о 6. індукція ВІС після NaHS, в/о 7. застосування дії напроксену + плацебо в/о 8. застосування поєднаної дії напроксену + PAG, в/о</p>	<p>5 5 5 5 5 5 5</p>

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4
	3) мг/кг/добу, <i>per os</i>) упродовж 9 діб та в поєднанні з впливом PAG (25 мг/кг/добу, в/о), СНН (3 ммоль/кг/добу, в/о), NaHS (100 мкмоль/кг/добу), і H ₂ S-напроксену (N-H ₂ S, АТВ-346) у дозі 14,5 мг/кг/добу, <i>per os</i> упродовж 9 діб та у поєднанні з гострим водно-іммобілізаційним стресом.	9. застосування поєднаної дії напроксену + NaHS, в/о 10. застосування дії напроксену + ВІС +PAG, в/о 11. застосування дії напроксену + ВІС + NaHS, в/о 12. застосування дії H ₂ S-напроксену+ плацебо, в/о + ВІС	5 5 5 5 N=60
3	З'ясування ролі H ₂ S на бар'єрну функцію та адаптаційно-компенсаторні реакції СОС за умов експериментальної NSAID-асоційованої езофагопатії та індукції ВІС: під час модифікації синтезу ейкозаноїдів шляхом блокуванням активності СОХ введенням ацетилсаліцилової кислоти (аспірину, ASA) у дозі 10 мг/кг/добу, <i>per os</i> , та H ₂ S-аспірину (H ₂ S-ASA) у дозі 17,5 мг/кг/добу, <i>per os</i> під час разового та 9-и денного введення) та поєднання з гострим водно-іммобілізаційним стресом.	1. контроль з плацебо, <i>per os</i> 2. дія ASA (разове введення) 3. дія H ₂ S-ASA (9-и денне введення) 4. дія ASA (разове введення) + ВІС 5. дія H ₂ S-ASA (разове введення) 6. дія ASA (9-и денне введення) + ВІС 7. дія H ₂ S-ASA (9-и денне введення) + ВІС	5 5 5 5 5 5 N=35
Всього			139

У дослідженнях ролі H₂S у захисних та адаптаційно-компенсаторних властивостях СОС використовували наступні реактиви і препарати: 30%

розчин фруктози (моносахарид, молекулярна формула $C_6H_{12}O_6$, молярна маса 180,16 г/моль, виробництва «Система Оптимум», Україна), блокатор активності COX шляху циклу арахідонової кислоти напроксен (препарат виробництва «Авант», Україна), ацетилсаліцилова кислота (препарат «Аспірин», виробництва «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна), а також модифікатори функціонування S-вмістких органічних сполук і каталітичної активності біорегуляторів синтезу H_2S : тетрахлорметан, пропаргілгліцин, карбоксиметил-гідроксиламін геміхлорид і натрій гідрогенсульфід, гібридні H_2S -NSAIDs: H_2S -напроксен (АТВ-346) та H_2S -аспірину (АТВ-340) (усі реактиви і препарати «Antibe Therapeutics Inc», Канада). Запропоновані засоби, їх дозозалежний ефект апробовано в лабораторних умовах за умов постановки дослідів на лабораторних тваринах головним науковим керівником «Antibe Therapeutics Inc, Toronto, Ontario» (Канада) Wallace J.L. et al. (2012-2017) [98, 164, 247-261, 282]. Усі дослідження виконували за стандартами доказової медицини, виокремлюючи групу контролю та застосовуючи дослідження з плацебо. Прилади, що використовувалися для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

2.2 Фізіологічні методи дослідження

Враховуючи унікальність будови і функцій стравоходу, складну систему нейро-гуморального контролю верхнього і нижнього стравохідних сфінктерів, а також короткий час проходження харчової грудки через просвіт стравоходу, існують труднощі у вивченні фізіологічних властивостей стравоходу та створенні моделей хвороб стравоходу на тваринах. Для експериментального моделювання уражень стравоходу та вивчення особливостей його захисних реакцій в експериментальній гастроентерології за даними сучасної літератури застосовуються різноманітні методи, що включають оперативні та реконструктивні техніки

(наприклад, трансгенні тварини), що є високовартісними, або вимагають тривалої підготовки і часу для реалізації, або складні у відтворюванності. Згідно пошуку наукових літературних даних (2010-2017 рр.) отримано дані, що на даний час не існує “золотого стандарту” серед моделей пошкоджень СОС на тваринах. У той ж самий час, з огляду на збільшення поширення неерозивного езофагіту та медикаментозних езофагітів у світі, існує нагальна потреба у опрацюванні їхніх моделей на тваринах, що будуть ревалентні до клінічних ознак найбільш поширених патологій стравоходу і зможуть допомогти зрозуміти у більш повній мірі фізіологічні механізми захисної та бар’єрної функцій епітеліального бар’єру стравоходу.

2.2.1 Методика дослідження впливу H_2S у бар’єрній функції слизової оболонки стравоходу за умов експериментального неерозивного езофагіту

Для вивчення механізмів, через які H_2S реалізує цитопротекторний вплив на СОС, застосовували принципи трансляційних досліджень для моделювання неерозивного езофагіту у тварин, що характеризується пошкодженнями бар’єрної та захисної функцій стравоходу у тварин, які були б максимально наближені та адекватні до ознак патологій стравоходу у людини. Для цього моделювали цитолітичні пошкодження слизової оболонки стравоходу пошкоджувальним впливом екзогенних речовин, що зумовлювали руйнівну дію на сірковмісні речовини або змінювали каталітичну активність ензимів, що беруть участь в утворенні H_2S .

Експериментальний езофагіт викликали токсичним впливом тетрахлорметану (CCl_4), здатного до деструкції сірковмісних амінокислот, у дозі 0,3 мл на 200 г з соняшnikовою олією з їжею, двократним введенням через 6 годин, з наступним періодом без їжі (12 год) і введенням готових розчинів згідно принципів подвійних сліпих досліджень. У якості плацебо застосовували 1,0 мл 0,9 % розчин $NaCl$, для зміни природнього цитопротекторного механізму циклу арахідонової кислоти вводили блокатор активності COX-2 напроксен (30

мг/кг/добу, в/о) і новосинтезовану сполуку гібридний NSAIDs, блокатор активності COX-2, здатний вивільняти H_2S *in vivo* – H_2S -асоційований напроксен (H_2S -напроксен), використовуючи АТВ-346 (Antibe, Therapeutics Inc; Canada) у дозі 43,5 мг/кг/добу, в/о. Тварин після евтаназії виводили з експерименту. Відпрепарувували стравохід, розрізали його вздовж, вивертали слизовою назовні, ретельно промивали фізіологічним розчином. Потім досліджували стан СОС макроскопічним оцінюванням і забирали зрізи з верхньої, середньої, нижньої третин стравоходу та місця переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка для морфо-функціональних досліджень цілісності епітеліального бар'єру СОС.

З урахуванням необхідності забезпечених безпечних умов для експериментаторів під час опрацювання моделей на тваринах, а також гіпоглікемічний вплив H_2S , опрацьовували на тваринах модель неерозивного езофагіту на тлі індукції тривалої постпрандіальної гіперглікемії, що згідно принципів доказової медицини є передумовою розвитку пре-метаболичного синдрому і характеризується підвищеним вмістом метилглюксалу, який має цитолітичну дію [104, 170]. Для цього застосовували висококалорійне харчування з підвищеним нутрієнтним складом вуглеводів за В.В. Козар, 2009 [143, 243], що ґрунтується на гіперкалорійному високовуглеводному раціоні шляхом збільшення споживання дозозалежної частки вуглеводів (HSD) за рахунок *ab libitum* доступу до 30% розчину фруктози в якості пиття впродовж 28 днів. У серійних дослідженнях на 29 день щурів виводили із експерименту і перед евтаназією застосовували модифікацію біосинтезу H_2S гальмуванням системи H_2S/CSE , вводячи PAG у дозі 25 мг/кг/добу маси тіла (в/о), та гальмуванням системи H_2S/CBS , вводячи СНН у дозі 3 ммоль/кг/добу маси тіла (в/о), і покращенням ендogenous біосинтезу, вводячи донор сірководню NaHS у дозі 100 мкмоль/кг/добу маси тіла. Методом кардіопунктури відбирали кров для подальших досліджень імуноферментним аналізом. Під час аутопсії видалляли і зважували стравохід. Видалений орган розрізали у повздовжному напрямі, промивали в охолоджену фізіологічному розчині та злегка промокали

фільтрувальним папером для макроскопічного аналізу пошкоджень та забирали нижню третину стравоходу для гістологічних досліджень, занурюючи у 10% розчин формаліну для подальшого виготовлення мікропрепаратів зрізів СОС та проведення аналізу пошкоджень епітеліального бар'єру за критеріями шкали гістологічного індексу ураження.

2.2.2 Методика дослідження значення H_2S у бар'єрній функції слизової оболонки стравоходу за умов порушення синтезу ейкозаноїдів

Для порушення синтезу ейкозаноїдів використовували експериментальне моделювання NSAIDs-асоційованих пошкоджень стравоходу, що викликали 9-денним введенням напроксену у дозі 30 мг/кг/добу внутрішньо (*per os*) або H_2S -напроксен у дозі 14,5 мг/кг/добу внутрішньо [164, 249, 259]. Для встановлення значення H_2S у бар'єрній функції цитопротекції слизової оболонки стравоходу у серійних дослідженнях на 9 день поєднували введення напроксену з введенням плацебо (0,9% розчин NaCl, в/о), щурам з модифікацією біосинтезу сірководню для гальмування H_2S/CSE системи вводили одноразово PAG у дозі 25 мг/кг маси тіла (в/о), для гальмування H_2S/CBS системи – одноразово СНН у дозі 3 ммоль/кг маси тіла (в/о), для збільшення синтезу $H_2S - NaHS$ у дозі 100 мкмоль/кг маси тіла (в/о) [257, 261]. Після евтаназії методом кардіопунктури відбирали кров для імуноферментних досліджень. Видаляли стравохід від глотки до шлунку, включно з місця переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка, розрізали його у повздовжньому напрямі, промивали фізіологічним розчином і підсушували для проведення макроскопічного оцінювання стану цілісності епітеліального бар'єру СОС та розрізали на верхню, середню та нижню третини стравоходу та виокремлюючи місце переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка, фіксуючи матеріал в 10% розчині формаліну для подальших гістологічних досліджень за шкалою індексу гістологічного ураження.

2.2.3 Методика дослідження значення H_2S у адаптаційно-компенсаторних механізмах слизової оболонки стравоходу за умов експериментального медикаментозного езофагіту

Для вивчення ролі H_2S у бар'єрних, захисних функціях та адаптаційно-компенсаторних механізмах стравоходу використовувати модель NSAIDs-асоційованої езофагопатії, що викликали 9-денним введенням напроксену у дозі 30 мг/кг/добу внутрішньо (*per os*), та вводили донор синтезу H_2S , одноразово NaHS у дозі 100 мкмоль/кг/добу (в/о) і гібридний H_2S -напроксен (H_2S -N, речовина АТВ-346, виробництво Antibe Therapeutics Inc; Канада) у дозі 14,5 мг/кг/добу внутрішньо та за умов поєднання з індукцією стресу моделюванням 3,5 годинного водно-іммобілізаційного стресу (ВІС) за Takagi et al., 1964, 1968 [236, 237]. Тварин поміщали в металеві перфоровані патрони для іммобілізації на 2 години, потім поміщали у воду, так щоб рівень води сягав яремної ямки щура. Температура води становила 24°C. Після перебування у воді тварин під загальним знечуленням виводили з експерименту. Відпрепаровували стравохід, розрізали його вздовж, вивертали слизовою назовні, ретельно промивали фізіологічним розчином. Потім досліджували стан СОС і забирали зрізи з нижньої третини стравоходу для морфо-функціональних досліджень пошкоджень СОС.

2.2.4 Визначення особливостей адаптаційно-компенсаторних механізмів слизової оболонки стравоходу за умов застосування модифікованих гібридних H_2S -NSAIDs.

У тварин викликали експериментальний NSAIDs-медикаментозний езофагіт разовим та 9-денним введенням аспірину (ацетилсаліцилової кислоти, ASA) у дозі 10 мг/кг (в-во «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна) або H_2S -аспирин (H_2S -ASA, АТВ-340 (4-(5-тіо-окси-5Н-дитіол-3-ил) фунил 2-ацетоксибензоат), гідроген-сульфід-вивільнюючий дериват аспірину (Antibe

Therapeutics Inc; Канада). Частині тварин моделювали гострий стрес за методикою ВІС [236, 237], яка за попередніми дослідженням найбільшою мірою відображає адаптаційно-компенсаторні властивості епітеліального бар'єру стравоходу за дії ульцерогенних чинників [293, 294]. Після завершення часу перебування у воді, тварин виводили з експерименту під загальним знечуленням і методом кардіопунтування забирали кров для імуноферментних досліджень ELISA. Стравохід відпрепарувували, розрізаючи його вздовж, вивертаючи слизовою назовні. Після ретельного промивання фізіологічним розчином досліджували стан СОС і забирали зрізи з верхньої, середньої та нижньої третини стравоходу для морфо-функціональних досліджень стрес-індукованих пошкоджень СОС.

2.3 Масометричні методи дослідження

Перед початком експериментів усіх тварин зважували для визначення маси тіла на механічній вазі (РН 10Ц13У, 100 г-10 кг, +5 г, Україна). Надалі, після виведення тварин з експерименту, відсепарувували стравохід, ретельно промивали фізіологічним розчином та підсушували. Потім, зважували на електронній вазі (Electronic balance, LT 1000В, 1000 г/0,1 г, Китай) і далі розділяли, виділяючи його верхню, середню та нижню третини, а також місце приєднання стравоходу до кардіальної частини шлунку.

У подальшому з отриманого матеріалу згідно стандартних вимог виготовлювали зрізи для гістологічних досліджень пошкоджень СОС.

2.4. Морфо-функціональні методи дослідження порушення цілісності слизової оболонки стравоходу

2.4.1 Макроскопічні дослідження

Після видалення стравоходу з органокомплексу і розрізання його у повздовжньому напрямку, застосовували загальну практику експериментальних

морфо-функціональних досліджень з вивчення макроскопічної структури СОС, враховуючи рекомендації міжнародної наукової номенклатурної групи Vevey (2011) про важкість езофагіту та розширення стандартної Лос-Анджелеської класифікації ГЕРХ, виокремлюючи нові стадії: М (мінімальні заміни, гіперемія, набряк СОС) та N (зміні відсутні) [168, 175, 210].

Для макроскопічного оцінювання змін СОС брали до уваги колір (блідорожевий, рожевий та інтенсивно багрянний), локалізацію пошкодження (верхня, середня та нижня третини стравоходу або місце приєднання стравоходу до кардіальної частини шлунку), їх форми з урахуванням характеру (гіперемія, ерозія, дрібно-точкові чи лінійні крововиливи, виразка, фокальний некроз), а також відсутність чи присутність набряку (без змін, мінімальний, помірний, виразний). Також зважували масу стравоходу і розраховували його відносно до маси тіла тварини (з перерахунку на 100 г маси тварини). У подальшому стравохід розрізали на верхню, середню й нижню третини та фіксували у 10% розчині. Для подальших досліджень отриманий матеріал заливали в парафін та виготовляли поперечні зрізи за загальноприйняною методикою. Зрізи зафарбовували гематоксилін-еозином та проводили гістологічний аналіз згідно загальнозживаних методів світової мікроскопії. Візуалізацію здійснювали з використанням мікроскопа (Swift Instruments International, Японія) і цифрової відеокамери (Echoo-Imager 5020200 Microscope Digital Eyepiece, Китай).

Виняткову увагу приділяли стандартизації отриманих результатів у кількісному та якісному вигляді згідно шкали гістологічного індексу уражень СОС у бальному оцінювання відносно запропонованих рекомендацій мікроскопічного езофагіту EsoHisto, 2011 [210]. Для уніфікації оцінювання пошкоджень різних відділів стравоходу брали під увагу відмінність у його будові у верхній, середній та нижній третинах стосовно гістологічних змін епітеліальної пластинки, власної пластинки, м'язової пластинки і підслизової основи за критеріями, представленими у табл. 2.2.

Ступінь вираженості гістологічних змін слизової оболонки стравоходу

	1 ступінь (контроль)	2 ступінь	3 ступінь
Епітеліальна пластинка			
Поверхневий шар			
Товщина	½ епітеліальної пластинки	однакова з епітеліальною пластинкою	2-3-кратно більша за епітеліальну пластинку
Нашарування	Відсутні	Незначні	Виражені
Ядра	Відсутні	Поодинокі	Множинні
Проміжний і базальний шар			
Товщина	3-4 шари	4-5 шарів	5-6 шарів
Поляризація	Поляризований	Часткова	Відсутня
Власна пластинка			
Мононуклеари	Поодинокі	Помірна кількість	Множинні
Лейкоцити	Відсутні	Помірна кількість	Множинні
Мікро-циркуляторне русло	Звичайної будови	Гіперемія	Гіперемія, гемостази
М'язова пластинка			
Підслизова основа			
Набряк	Відсутній	Нерівномірний	Виражений
Мікро-циркуляторне русло	Звичайної будови	Дилятація	Гіперемія
Підслизове нервово сплетіння			
М'язова оболонка			
Міоцити	Відсутні зміни	Зміни міжклітинних проміжків	Дезорганізація міоцитів

2.4.2 Гістологічні дослідження

Для характеристики бар'єрної функції стравоходу використовували функціональний аналіз та комплексний гістологічний індекс ураження (ГІУ) з урахуванням наступних кількісно-якісних критеріїв ступеня змін СОС (табл.2.3).

Таблиця 2.3

Критерії для встановлення гістологічного індексу ураження слизової оболонки стравоходу

№	Складові гістологічного індексу ураження слизової оболонки стравоходу за візуально-аналоговими змінами
1	Стан епітеліальної пластинки за ступенем альтерації: 0 – зміни відсутні 1 – розшарування нерогового шару 2 – вогнищева базофілія мас кератину 3 – десквамація клітинних мас, вакуолізація клітин базального шару, везикулярні ядра 4 – ерозія
2	Стан підепітеліальних структур за індексом змін строми: 0 – відсутні зміни 1 – дифузний набряк підслизової основи 2 – виражений нерівномірний набряк підслизової основи та незначна інфільтрація 3 – виражений набряк та дезорганізація підслизової основи 4 – периваскулярні або субепітеліальні інфільтрати, периваскулярні крововиливи
3	Стан лейкоцитарної інфільтрації епітеліальної пластинки: 0 – відсутня лейкоцитарна інфільтрація 1 – помірна лейкоцитарна інфільтрація 2 – середня лейкоцитарна інфільтрація 3 – виражена лейкоцитарна інфільтрація 4 – лейкоцитарні інфільтрати

Продовження таблиці 2.3

4	Стан м'язової оболонки за проявами некрозу: 0 – відсутній 1 – каріорексис, каріопікпоз 2 – фокальний некроз 3 – множинні вогнища некрозу 4 – генералізований некроз
---	--

Комплексний ГПУ обраховували як сума складових стану компонентів СОС у балах.

2.5 Дослідження методами молекулярної біології

Серед основних методів у проведенні сучасних досліджень в гастроентерології є методи молекулярної біології, які дозволяють ефективно вивчати фундаментальні та прикладні аспекти фізіологічних процесів. Для дослідження ролі H_2S у неспецифічних і специфічних захисних реакціях СОС вивчали особливості цитокінової регуляції.

2.5.1 Імуноферментні методи дослідження

Для встановлення виразності прозапальних реакцій досліджували баланс про- та протизапальних реакцій за вмістом ІЛ-6, що являє собою прозапальний цитокін, який є маркером наявності альтерації та гострої фази запалення, ІЛ-10 – протизапального цитокіну, ІЛ-17 – опосередковує хемоатракцію моноцитів і нейтрофілів до місця запалення, GCP-2 – біомаркер СХС родини хемокінів, що залучені у запальні сигнальні шляхи і спричиняє атракцію нейтрофільних лейкоцитів. Процедуру імуноферментного дослідження проводили згідно інструкції виробників.

Для визначення вмісту ІЛ-6 (пг/мл) і GCP-2 (пг/мл) у сировотці крові використовували мікропланшети, покриті антитілами проти молекул ІЛ-6 (анти-ІЛ-6) і молекул GCP-2 (анти-GCP-2), виробництва "Multi-Analyte ELISArray® Kit, Cedarlane Labs" (Канада), відповідно. Під час реакції у лунки полістиролового планшету (Costar 9017, США) додавали стандарти з відомими концентраціями анти-ІЛ-6 і GCP-2, контроль та зразки сироватки крові з різних експериментальних груп з невідомими концентраціями анти-ІЛ-6 і GCP-2. Під час першої інкубації ІЛ-6 і GCP-2 зв'язувалися довільно з іммобілізованими у лунках антитілами одним сайтом зв'язування. Після промивання додавали біотинильовані антитіла проти ІЛ-6 і GCP-2, які під час другої інкубації зв'язувалися з іммобілізованими ІЛ-6 і GCP-2, що утворилися під час першої інкубації. Після видалення надлишка других антитіл додавали стрептавидин-пероксидазу, що зв'язується з біотинильованими антитілами з формуванням «сендвіч-комплексу» з 4 реагентів. Після третьої інкубації та промивання, видаливши залишки незв'язаного ензиму, після чого додавали субстратний розчин, що взаємодіє з ензимом для утворення кольорового комплексу. Інтенсивність зафарвлення розчину, що прямо пропорційна концентрації ІЛ-6 і GCP-2, який присутній у досліджуваному зразку, вимірювали фотометрично (GBG Stat-Fax 303 Plus Microstrip Reader, №: 303-11851, виробництва США) при 450 ± 10 нм упродовж 10 хвилин після додавання стоп розчину (коефіцієнт варіації < 10%)

Для визначення вмісту ІЛ-10 (пг/мл) і ІЛ-17 (пг/мл) у сировотці крові використовували мікропланшети покриті антитілами проти молекул ІЛ-10 (анти-ІЛ-10) і молекул ІЛ-17 (анти-ІЛ-17), виробництва "Вектор-бест" (Росія). Під час реакції у лунки полістиролового планшету (Costar 9017, США) додавали стандарти з відомими концентраціями анти-ІЛ-10 і анти-ІЛ-17, контроль та зразки сироватки крові з різних експериментальних груп з невідомими концентраціями анти-ІЛ-10 і анти-ІЛ-17. Під час першої інкубації ІЛ-10 анти-ІЛ-17 і зв'язувалися довільно з іммобілізованими у лунках антитілами одним сайтом зв'язування. Після промивання додавали

біотинильовані антитіла проти IL-10 і IL-17, які під час другої інкубації зв'язувалися з імобілізованими IL-10 і IL-17, що утворились під час першої інкубації. Після видалення надлишка других антитіл додавали стрептавидин-пероксидазу, що зв'язується з біотинильованими антитілами з формуванням «сендвіч-комплексу» з 4 реагентів. Після третьої інкубації та промивання, видаливши залишки незв'язаного ензиму, після чого додавали субстратний розчин, що взаємодіє з ензимом для утворення кольорового комплексу. Інтенсивність забарвлення розчину, що прямо пропорційна концентрації IL-10 і IL-17, який присутній у досліджуваному зразку, вимірювали фотометрично (GBG Stat-Fax 303 Plus Microstrip Reader, №: 303-11851, виробництва США). Результат реєструвати на фотометрі при 450 нм упродовж 10 хвилин після додавання стоп розчину (коефіцієнт варіації < 10%).

2.6 Статистична обробка результатів

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) використанням параметричних та непараметричних методів оцінки. Оцінювали характер розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів, встановлювали середні значення кожної ознаки, що вивчалась і величини стандартних помилок (у разі правильного розподілу) та квадратичних відхилень (у разі неправильного розподілу). Достовірність відмінностей між незалежними кількісними величинами визначали при правильному розподілі за допомогою t-критерія Стьюдента, а при неправильному розподілі – за допомогою U-критерія Мана-Уїтні. Достовірними вважали дані, коли* – $p < 0,05$. Кількість тварин для кожного дослідження вказували у дужках (n=).

Узагальнення інформації, що наведена у даному розділі дозволяє зробити наступні висновки:

– вибір об'єктів та засобів дослідження дозволяє адекватно дослідити механізми цитопротекції СОС за умов гіперглікемії;

– запропоновані модельні дослідження з модифікацією активності природного цитопротекторного газового медіатора H_2S є співвідносними до етіопатогенетичних механізмів формування клінічних ознак НЕРХ, дають можливість об'єктивно описати генез змін епітеліального бар'єра стравоходу і описати ступінь змін СОС;

– дослідження механізмів реалізації впливу H_2S на бар'єрну функцію слизової оболонки стравоходу за умов впливу чинників різної етіології, використанням експериментальних моделей неерозивного езофагіту, медикаментозної езофагопатії, застосуванням корекції гібридними новоствореними сполуками донорів сірководню, що містять фрагменти відомих лікарських препаратів NSAIDs і спроможні вивільняти H_2S (гібридні H_2S -асоційовані NSAIDs), доповнять знання про фізіологічну роль цього важливого газового медіатора та у майбутньому допоможе розробити нові засади превентивних та лікувальних заходів щодо езофагопатій.

РОЗДІЛ 3
ОСОБЛИВОСТІ БАР'ЄРНОЇ ТА ЗАХИСНОЇ ФУНКЦІЙ
СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТРАВОХОДУ
ЗА УМОВ МОДИФІКАЦІЇ ВМІСТУ СІРКОВМІСНИХ СПОЛУК

На даному етапі досліджень було з'ясовано роль сірководню у бар'єрній функції стравоходу унаслідок змін вмісту сірковмісних сполук та дослідженням його впливу на цитопротекторні властивості СОС. В останні роки набуває актуальності розробка фізіологічно обґрунтованих неінвазивних експериментальних моделей захворювань стравоходу, що дозволятимуть вивчати ранні прояви порушень цілісності епітеліального бар'єру стравоходу та особливості молекулярних та біохімічних механізмів під час формування преульцерогенних пошкоджень, включно з неерозивними змінами у СОС у аспекті з'ясування ролі сірководню [9, 34]. Відомо, що ендогенна сірка є складовою багатьох сірковмісних сполук (амінокислот, вітаміноподібних сполук та інших), що забезпечують процеси життєдіяльності клітини, а також метилування та транссульфурування, баланс редокс-потенціалу, а також для утворення сірководню у десульфуразному шляху [48, 113, 114, 195, 229]. Проте значення сірковмісних сполук для забезпечення бар'єрної функції стравоходу залишаються остаточно нез'ясованим.

З іншого боку, аналіз літератури свідчить, що все більше з'являється численних повідомлень про потенціал H_2S , як "скавенджера", що може збільшувати ендогенні антиоксидантні властивості, протизапальні, вазотропні, антиагрегантні, фібринолітичні ефекти у дистальному відділі травної системи *in vivo* [121, 123, 134, 174, 188, 204, 230], проте його застосування для покращення цитопротекторних функцій СОС залишається недостатньо вивченим.

3.1 Дослідження впливу ендогенних сірковмісних сполук на захисну та інтегративну функції епітеліального бар'єру слизової оболонки стравоходу за умов впливу тетрахлорметану та модифікації синтезу ейкозаноїдів дією напроксену та H₂S-напроксену (АТВ-346)

Для вивчення ульцерогенезу в СОС в експериментальній медицині використовують трансгенних (англ.: knock-in/knockout models) тварин і численні інвазивні та неінвазивні моделі: імуногенні, хірургічні з оперативними втручаннями (створення анастомозу/ів) або накладанням лігатур, внутрішньостравохідним перфузуванням кислотного-пепсинових та трипсино-жовчних розчинів, індукцією стресу, введенням неселективних і селективних СОХ блокаторів [8, 236, 253, 256]. Однак, існують труднощі (висока вартість, довготривале спостереження в експерименті, післяопераційні ускладнення, погана відтворюваність тощо) для виконання таких досліджень. Враховуючи дані, що серед ендогенних цитопротекторів важливу роль мають сірковмісні сполуки, то логічним буде, що блокування їх дії екзогенними чинниками спричинює порушення численних клітинних процесів, таких як клітинна адгезія, апоптоз, проліферація, сигнальна трансдукція [28, 29, 32, 73].

З огляду на такі обставини нашу увагу привернув метод індукції ульцерогенезу хімічним блокуванням сульфгідрилів (SH) у дванадцятипалій кишці з використанням цистаміну S. Szabo (1973-1979), що також використовується і для індукції ерозивного коліту S. Szabo, Saton H. et al., 1997 [207, 214, 232, 233]. Враховуючи, важливість відтворення у експериментальному моделюванні на тваринах етіопатогенезу патології, нами було обрано опрацювання моделі НЕРХ на тваринах класичним хімічним способом за допомогою тетрахлорметану (CCl₄), потужного індуктора вільнорадикального окиснення та активних форм кисню, що спричинює ушкодження клітинних та субклітинних структур [38, 73, 267]. Встановлено, що ознаки індукованих CCl₄ пошкоджень близькі до змін, які виникають у людини під час патологій, пов'язаних з оксидативним стресом [76]. Нашими

попередніми дослідженнями встановлено важливість функціональної активності внутрішньоклітинних систем захисту у езофагопротекції [288, 291-293]. Згідно даних літератури доказано, що високотоксична цитодеструктивна дія NSAIDs є частою побічною дією основної терапії [5, 14, 27, 50], проте на даний час у доступних нам джерелах наукової літератури дія CCl_4 в поєднанні з NSAIDs на СОС не досліджувалась.

Метою даного етапу роботи було з'ясувати особливості цілісності епітеліального бар'єру слизової оболонки стравоходу у щурів під час уражень, індукованих CCl_4 та в умовах додаткового впливу зміни активності COX (введення напроксену) та застосування сполуки-гібриду NSAIDs, поєданого з H_2S , H_2S -напроксену (АТВ-346), що володіє властивостями основної частини молекули (протизапальна дія) та завдяки введенню сірководню дозволяє очікувати додаткові активності унаслідок вазотропної та протизапальної дії.

З метою підтвердження змін цілісності епітеліального бар'єру стравоходу за умов впливу CCl_4 ми визначили відмінності у відносній масі стравоходу в тварин експериментальних груп (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Вплив тетрахлорметану (CCl_4) на відносну масу стравоходу (мг/100 мг маси тіла); $M \pm m$; $n=5$; $*P < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Встановлено, що її збільшення виникло у тварин, які зазнали дії CCl_4 до 25% ($p < 0,05$) порівняно до показників у контрольній групі.

Проведено гістологічне дослідження епітеліального бар'єру стравоходу виявило значне потовщення рогового шару у групі тварин, що зазнали впливу CCl_4 , товщина якого відповідала 2-3-ом товщинам епітелію у порівнянні до результатів контрольної групи, в якій вона склала лише половину товщини епітеліального шару (рис. 3.2 а і б). У СОС щурів, які отримували поєднання вливу CCl_4 і H_2S -напроксену, що є сполукою, збагаченою сірководнем, ознаки змін підслизової основи були помірними, підепітеліальний набряк та зміни епітеліальної пластини були відсутні (рис. 3.2 в).

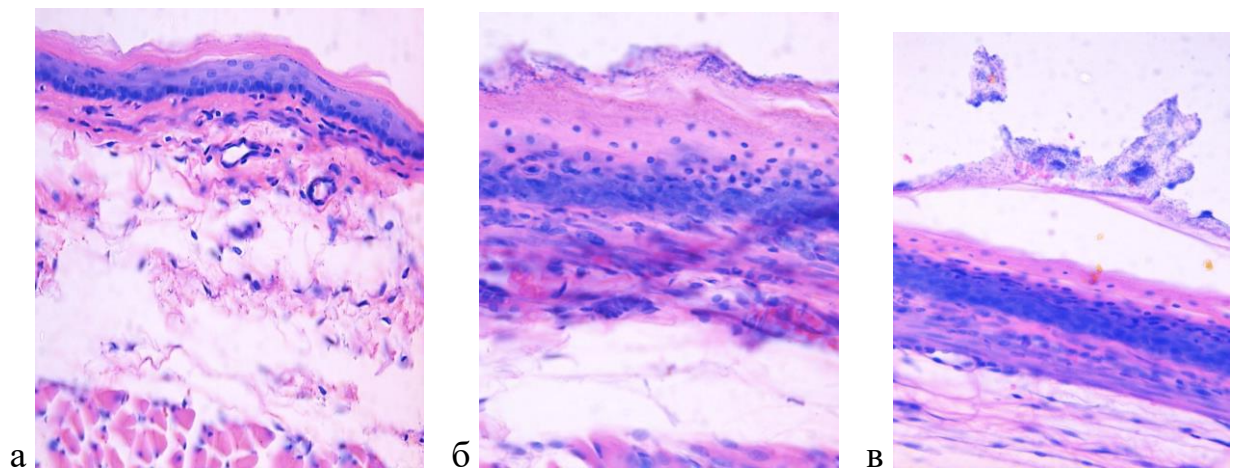


Рис. 3.2. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів у нормі (а), за умов токсичної дії тетрахлорметану (б) та в поєднанні з введенням напроксену (в; 30 мг/кг, в/о); фарбування Г/Е, $\times 400$.

Також встановлено виражені поверхневі базофільні нашарування: дифузні дрібногранулярні або великі вогнища, які виступають над поверхнею. У нижній третині стравоходу серед мас кератину наявні множинні збережені ядра клітин, потовщення епітеліального шару сягало 5-6-и рядів епітеліоцитів. Більше того, ознаки поляризації епітелію були

відсутні, клітини з гіперхромними ядрами та нечіткою цитоплазмою розміщувалися по всій товщі епітеліального шару. У м'язовій пластинці виявлено виражений субепітеліальний поліморфноклітинний інфільтрат: множинні мононуклеарні клітини та поліморфноядерні лейкоцити.

Особливості характерних зміни ангіоархітектоніки у влвсній пластинці та підслизовій основі представлено у Таб. 3.1.

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика пошкоджень слизової оболонки стравоходу за умов впливу тетрахлорметану, та поєднаної дії тетрахлорметану з напроксом, H₂S-напроксом (АТВ-346)

	Контроль	Тетрахлор-метан	Тетрахлор-метан + напроксен	Тетрахлор-метан + АТВ-346
Поверхневий шар епітеліальної пластинки				
Товщина	½ епітеліальної пластинки	2-3-кратно до епітеліальної пластинки	Однаковий з епітелієм	Однаковий з епітелієм
Нашарування	Відсутні	Виражені	Незначні	Відсутні
Ядра	Відсутні	Множинні	Поодинокі	Поодинокі
Порожнистий і базальний шар епітеліальної пластинки				
Товщина	3-4 шари	5-6 шари	4-5 шари	4-5 шари
Поляризація	Поляризований	Відсутня	Відсутня	Відсутня
Власна пластинка				
Мононуклеари	Поодинокі	Множинні	Поодинокі	Поодинокі
Лейкоцити	Відсутні	Множинні	Помірна кількість	Помірна кількість
Судини	Звичайні	Гіперемія, лейкостаз	Гіперемія	Звичайні
Підслизова основа				
Набряк	Нерівномірний	Виражений	Нерівномірний	Нерівномірний
Судини	Звичайні	Гіперемія	Нерівномірно дилатовані	Звичайні

Ознаками цитотоксичного впливу CCl_4 для стромы СОС було ураження вазотропного компоненту, що виявлялось як судинна гіперемія, місцями з вираженим лейкоцитозом.

За умов поєднання введення СОХ та дії CCl_4 встановлено відсутність змін епітеліальної пластинки, проте у підслизовій основі присутній виражений набряк, гіперемія судин мікроциркуляторного локального кровопостачання (рис. 3.3 а), що відповідає гістологічним ознакам неерозивного езофагіту [5, 220].

Застосування H_2S -напроксену (АТВ-346) показало відсутність нашарувань у роговому шарі та змін судин у власній пластинці та підслизовій основі СОС.

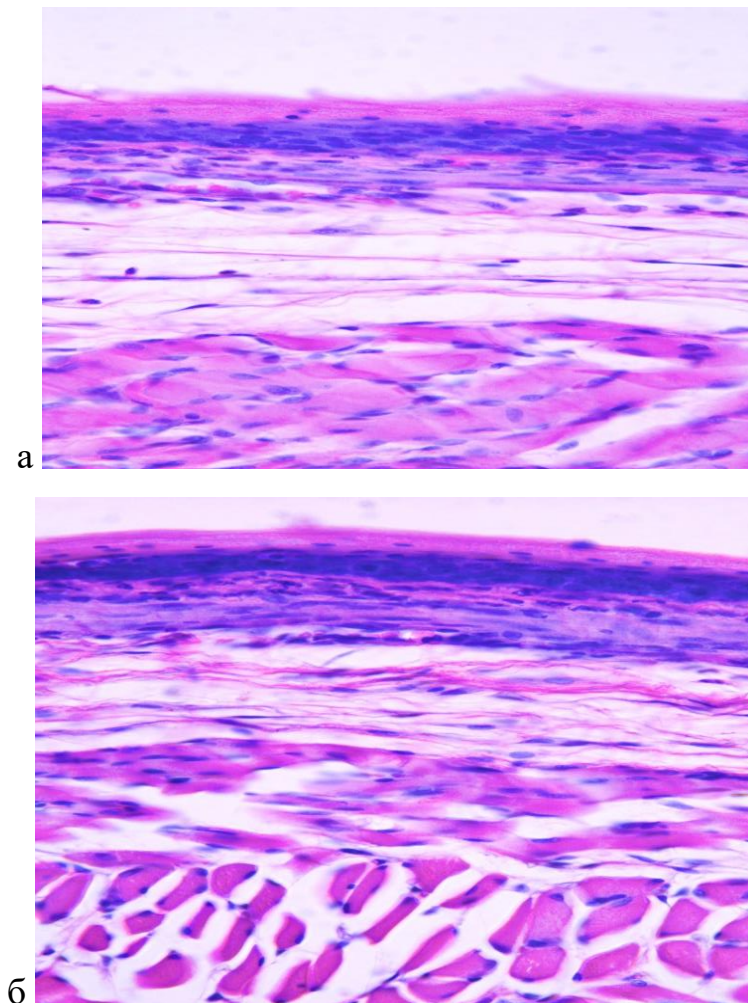


Рис. 3.3. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів у нормі, за умов токсичної дії тетрахлорметану та поєднання з введенням напроксену (а) або H_2S -напроксену (АТВ-346; 43,5 мг/кг, в/о) (а, б); фарбування Г/Е, $\times 400$.

Таким чином, отримані результати наших досліджень, дозволяють зробити висновок про можливість індукції неерозивного езофагіту цитотоксичною дією CCl_4 та модифікацією активності циклооксигенази, що за характером ознак руйнування епітеліального бар'єру стравоходу співвідносні з критеріями Esohisto, 2008 [210, 276]. Натомість, дія гібридного H_2S -напроксену, що є сполукою, в якій присутня хімічна група, що є донором сірководню, виявляла цитопротекторний вплив на СОС, нівелюючи вплив тетрахлорметану.

3.2 Визначення впливу гіперглікемії та вилучення $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ і $\text{H}_2\text{S}/\text{CBS}$ систем і дії донора сірководню на особливості бар'єрної та захисної функцій епітеліального бар'єру слизової оболонки стравоходу

За даними літератури відомо, що гіперглікемія сприяє надлишковому утворенню метилгліоксалу, який має виразну пошкоджувальну цитоагресивну дію [170]. З другого боку, знано, що система сірковмісних сполук, а саме глутатіону, володіє активністю швидко знижувати вміст кінцевих продуктів глікації (неензимного глікозювання; AGEs, від англ.: advanced glycation end products) [112, 143]. Оскільки, існують переконливі докази, що H_2S збільшує активність ендогенних антиоксидантів-глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази і забезпечує клітинний захист за умов гіперглікемії [46, 125, 296], ми припустили, що блокування активності $\text{H}_2\text{S}/\text{CSE}$ і $\text{H}_2\text{S}/\text{CBS}$ систем біосинтезу сірководню матиме уражувальну дію. Подібні результати отримано в дослідженнях на генетично-модифікованих тваринах (напр., щурах лінії Goto-Kakizati) іншими дослідниками [180], проте проведення таких досліджень має недолік – вони дуже коштовні. На сьогодні дослідження поєданого впливу модифікації утворення H_2S та гіперглікемії на бар'єрну та захисну функції епітеліального бар'єру слизової оболонки стравоходу *in vivo* на тваринах, що без генетичних модифікацій, згідно доступної нам наукової літератури не проводились.

Оскільки, альтерація СОС під час індукції пошкоджень супроводжується запальною реакцією та набряком, ми з'ясували, як змінюється маса даного органу у тварин (рис. 3.4). Досліди за умов гіперглікемії показали, що у щурів спостерігалось збільшення відносної маси стравоходу на 15% ($P < 0,05$) у порівнянні до тварин контрольної групи, тоді як у тварин, яким моделювали модифікацію біосинтезу сірководню, гальмуванням H_2S/CSE і H_2S/CBS систем біосинтезу H_2S , зміни сягали 18-20% ($P < 0,01$) порівняно з контрольною групою, тоді як за застосування неорганічного донора утворення сірководню ($NaHS$) – показники практично наближались до даних тварин без гіперглікемії (див.рис. 3.4).

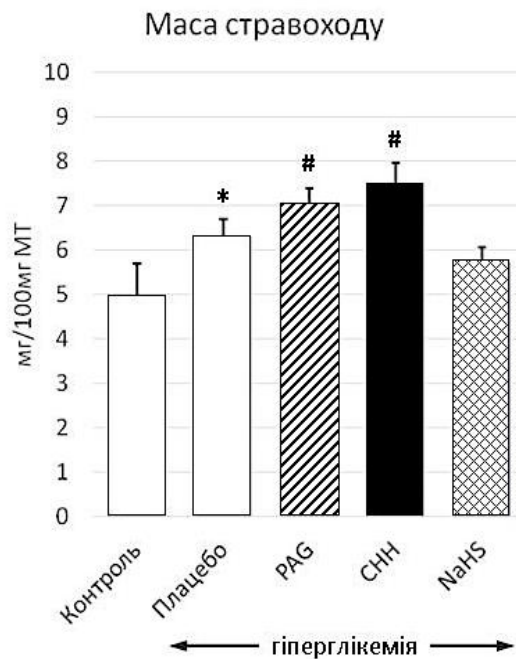


Рис. 3. 4. Маса стравоходу щурів за умов гіперглікемії та введення плацебо, пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг, в/о), карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (SHH; 3 ммоль/кг, в/о) і натрію гідрогенсульфід (NaHS; 100 мкмоль/кг, в/о); $M \pm m$; $n=6$; * $P < 0,05$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі (інтактні щури).

Гістологічне дослідження зрізів стравоходу у нижній третині показало, що гіперглікемія сприяла появі пошкоджень СОС, які відповідають критеріям неерозивного езофагіту. Зокрема, виявлено руйнування поверхневого шару, ознаки гіперкератинізації, спонгіоз та папілярну елонгацію епітелію, розширені судини у кінцевих папілях і набряк підслизової основи (рис. 3.5 а).

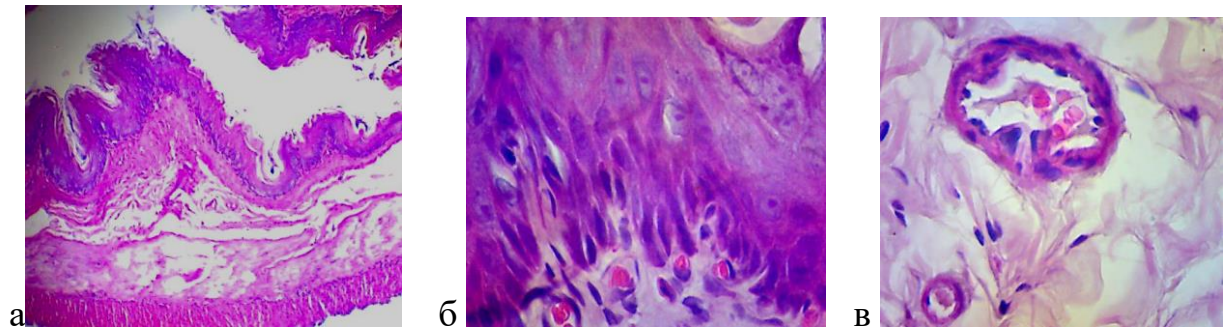


Рис. 3.5. Зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов гіперглікемії та введення плацебо (а), $\times 40$; пропаргілгліцину (РАG; 25 мг/кг/добу, в/о) (б), $\times 400$; карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг/добу, в/о) (в); фарбування Г/Е, $\times 400$

Застосування вилучення H_2S/CSE системи біосинтезу H_2S у більшій мірі, ніж H_2S/CBS системи, сприяло появі десквамації епітелію, товщина слизової оболонки збільшилась порівняно до контрольної групи та виявлено дезорганізацію структур строми (рис. 3.5 б).

Для структур строми було характерним поява геморагій та мікротромбів у підслизовій основі, простежувалось відшарування епітеліальної пластинки від підслизової основи та інтенсифікація набряку, лейкоцитарна інфільтрація та посилення гістопатологічних ознак ерозивного езофагіту (рис. 3.3 в), тоді як екзогенне введення $NaHS$ зменшувало чутливість СОС до цитолітичної дії гіперглікемії (рис. 3.6).

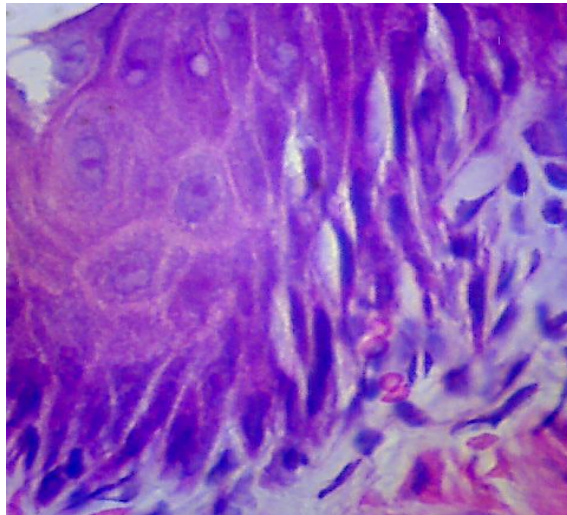


Рис. 3.6. Слизова оболонка стравоходу щурів за умов гіперглікемії і введення натрію гідрогенсульфід (NaHS ; 100 мкмоль/кг/добу, в/о); фарбування Г/Е, $\times 400$.

Виявлено зменшення міжклітинних проміжків, епітеліальної лейкоцитарної інфільтрації, мікротромбів, а також встановлено, що підепітеліальний набряк був нерегулярним.

Далі ми визначали як змінюються ознаки пошкодження СОС у щурів експериментальних груп за ранжуванням ГПУ (рис. 3.7). Встановлено, що після введення PAG на тлі гіперглікемії за умов суттєвого зниження H_2S спостерігається майже удвічі збільшення ГПУ ($P < 0,01$) відносно показників тварин «умовної контрольної» групи тварин (з гіперглікемією та нормальним синтезом H_2S). У разі використання NaHS в якості екзогенного впливу донора біосинтезу утворення H_2S , ГПУ епітеліального бар'єру СОС не змінився порівняно з контролем.

Відомо, що характерною особливістю впливу H_2S є модуляція захисними властивостями в організмі [185, 283], які можна оцінювати за вивільненням прозапальних та протизапальних цитокінів. Ми перевірили, як змінюється активність цитокінового регулювання за вмістом протизапального IL-10 та прозапального IL-17 за умов модифікації утворення сірководню.

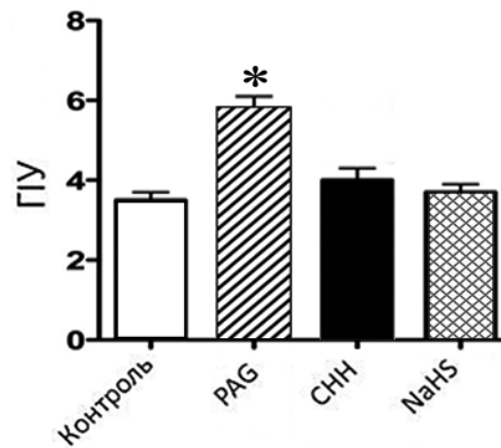


Рис. 3.7. Зміни гістологічного індексу ураження (ГІУ) слизової оболонки стравоходу за модифікації біосинтезу сірководню гальмуванням H_2S/CSE і H_2S/CBS систем біосинтезу H_2S (введенням пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о) і карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг/добу, в/о), відповідно), та застосуванням натрію гідрогенсульфід (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о); $M \pm m$; $n=6$; $*P<0,05$ порівняно до показників “умовної” контрольної групи (щурі з гіперглікемією).

Середнє значення вмісту ІЛ-10 у сироватці крові щурів “відносної” контрольної групи з 28-денною гіперглікемією становило $24,92 \pm 1,83$, а для ІЛ-17 – $7,123 \pm 0,602$. Під час розвитку неерозивного езофагіту у щурів виявляли збільшення синтезу прозапального ІЛ-17 у 2,5 раза за умов застосування PAG для гальмування H_2S/CBS систем ($P<0,05$) і під час використання СНН для гальмування H_2S/CSE систем утворення H_2S ($P<0,05$) в порівнянні до показників контрольної групи. Дію NaHS можна охарактеризувати як протизапальну, оскільки вміст ІЛ-17 був менший, ніж у разі введення PAG і СНН ($P<0,05$) у порівнянні до показників “відносної” контрольної групи ($P<0,05$). Вміст протизапального інтерлейкіну ІЛ-10 на тлі експериментального езофагіту зменшувався під час застосування PAG до $15,23 \pm 0,68$ пг/мл ($P<0,05$), тоді як за введення СНН – майже не змінилась порівняно з даними контролю. У щурів, що екзогенно отримували донор утворення H_2S введенням NaHS, вміст

IL-10 наближався до показників «умовної норми» тварин контрольної групи (рис. 3.8).

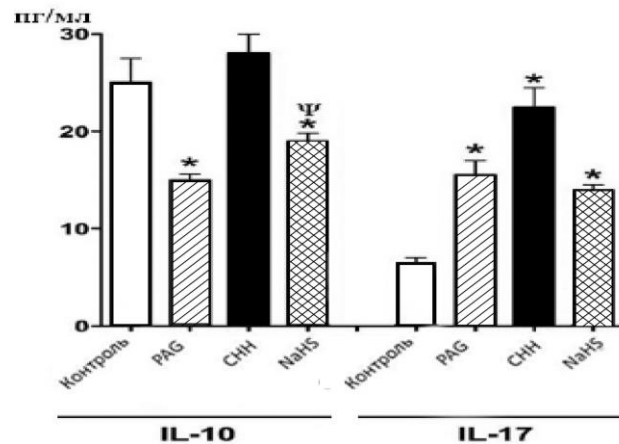


Рис. 3.8. Вплив пропаргліцину (PAG; 25 мг/кг, в/о) і карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг, в/о) та натрію гідросульфід (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) на вміст IL-10 та IL-17 у сироватці крові; $M \pm m$; $n=6$; * $P < 0,05$ порівняно до показників “відносної” контрольної групи у щурів з гіперглікемією.

Таким чином, інтенсифікація запалення після модифікації біосинтезу сірководню гальмуванням H_2S/CSE і H_2S/CBS систем біосинтезу H_2S на тлі гіперглікемії у щурів асоціювалась з підвищенням вмісту прозапального цитокіну IL-17 та зменшенням вмісту протизапального цитокіну IL-10, що обмежує розвиток імунних реакцій. Натомість, дія неорганічного донора NaHS зменшувала вміст прозапального IL-17 та протизапального цитокіну IL-10 у незначній мірі, що вступає у певне протиріччя з очікуваним. Такий ефект можна пояснити тим, що довготривала дія гіперглікемії викликала достатньо високий рівень хронічного запалення, яке одноразовим введенням донора синтезу NaHS не можливо зменшити.

3.3 Дослідження ролі H_2S у адаптаційно-компенсаторних реакціях слизової оболонки стравоходу за умов гальмуванням H_2S/CSE і H_2S/CBS систем біосинтезу H_2S , дії $NaHS$ та у поєднанні зі стресом

Для оцінювання цілісності та адаптаційно-компенсаторних властивостей епітеліального бар'єру органів травлення та визначення виразкозагоювального впливу будь-якого засобу в експериментальній медицині після досліджень Н. Selye (1936), який вперше описав характерну "тріаду" у стрес відповіді: появу ерозивно-виразкових уражень слизової шлунку, гіпертрофію наднирників та атрофію тимусу, використовують вивчення стрес-асоційованих пошкоджень певного органу [59, 141, 142, 144, 163, 215, 220]. У подальшому було встановлено, що стрес індукує стрес-асоційовані пошкодження у всіх відділах травної системи, проте існує різна специфічна сприйнятливність епітеліального бар'єру до його впливу [182, 190]. Ґрунтуючись на наших попередніх дослідженнях, що блокування природного синтезу сірководню на тлі гіперглікемії викликає порушення цілісності СОС та сприяє розвитку запалення, ми вирішили перевірити як гальмуванням H_2S/CSE і H_2S/CBS систем біосинтезу сірководню змінить бар'єрну функцію СОС та як вплине застосування донора синтезу H_2S на її чутливість до стресу. Для цього, щоб з'ясувати роль H_2S на перебіг процесів езофагопротекції ми вивчали зміни у стравоході через 2 год після одноразового введення PAG , CHN , $NaHS$ і після індукції стрес-асоційованого езофагіту за допомогою 3,5 год водно-іммобілізаційного стресу (Takagi, 1964) [236] з попереднім одноразовим введенням 1,0 мл фізіологічного розчину, в/о, та неорганічного донора синтезу сірководню $NaHS$ з введенням 100 мкмоль/кг (в/о) в якості корекції.

Гістологічне дослідження зрізів нижньої третини стравоходу показало, що за умов індукції стрес-асоційованого езофагіту виникає деструкція епітеліального бар'єру, наявні ерозивно-геморічні пошкодження, десквамація епітелію у просвіт, роз'єднання

епітеліальних клітин, відшарування епітеліальної пластинки від строми, інфільтрація імунними клітинами власної пластинки, мікротромби та руйнуванням м'язової пластинки (рис. 3.9 а, б).

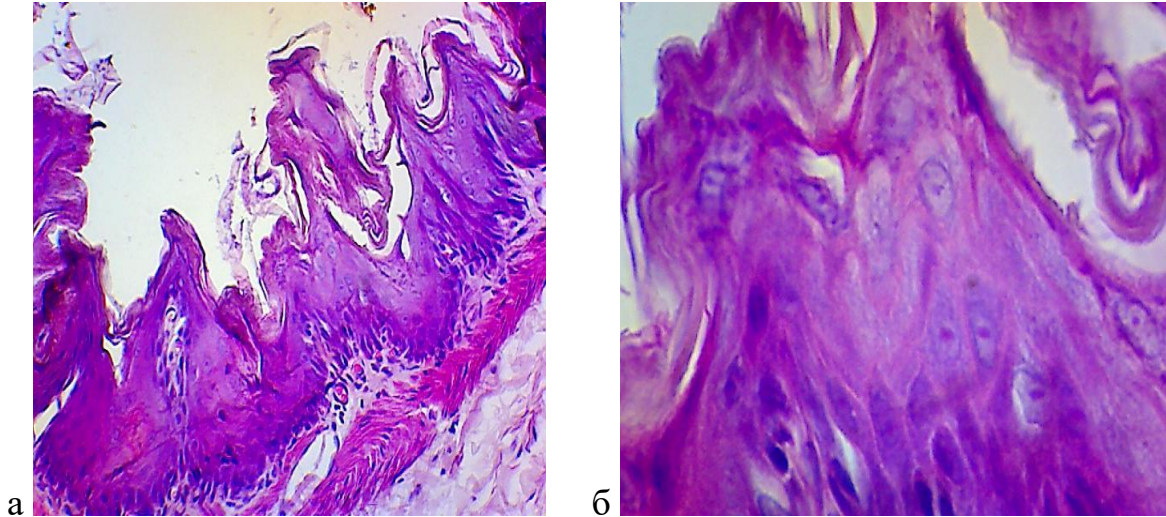


Рис. 3.9. Вплив стресу на зміни слизової оболонки у нижній третині стравоходу щурів; фарбування Г/Е, $\times 400$.

Введення щурам PAG супроводжувалось індукцією пошкоджень неерозивно-геморагічного характеру, що за гістоморфологічними характеристиками наближались до стрес-індукованих пошкоджень СОС. За ранжуванням ГІУ PAG-індуковані пошкодження СОС понад вдвічі ($6,600 \pm 0,547$) перевищували показники тварин, яким застосовували введення СНН ($2,400 \pm 0,547$), що підтверджувало потужне вилучення вазотропного компонента езофагопротекції за умов нестачі синтезу сірководню індукція стресу викликала аналогічні зміни у СОС, як у разі введення PAG ($P < 0,05$). Стравохід щурів з застосування одинарного введення NaHS не змінювало стан СОС (рис. 3.10). Попереднє введення NaHS об'легшувало гістопатологічні ознаки стрес-асоційованого езофагіту (рис. 3.10), що характеризувалось зменшенням ГІУ до значень тварин, які не отримували корекції ($P < 0,05$) (рис. 3.11).

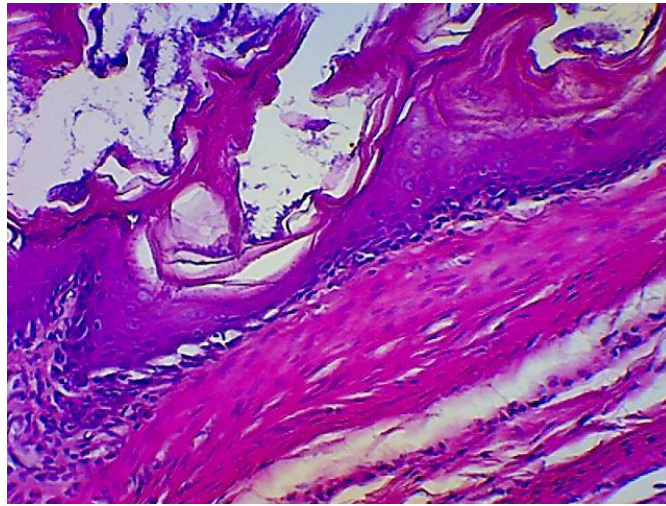


Рис. 3.10. Вплив натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) за умов індукції стресу на слизову у нижній третині стравоходу щурів; фарбування Г/Е, $\times 400$.

За ГІУ ознаки експериментального стрес-асоційованого езофагіту (рис. 3.11) були співвідносними з впливом PAG ($P < 0,05$).

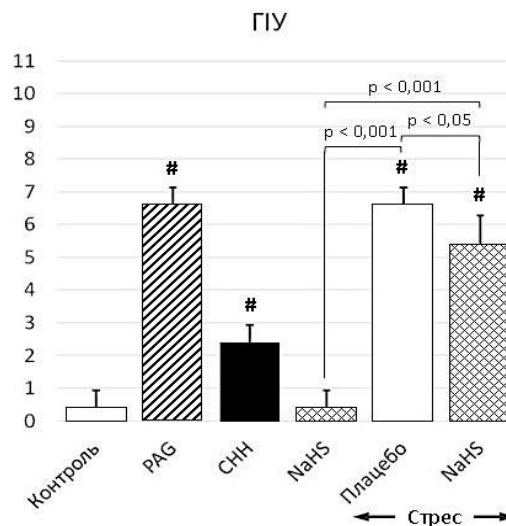


Рис. 3.11. Гістологічний індекс ураження (ГІУ, у балах) за умов моделювання утворення сірководню за дії пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг/добу, в/о) і натрію гідрогенсульфід (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) та в поєднанні зі стресом; $M \pm m$; $n=5$; $*P < 0,05$; $\#P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Відомо, що ерозивно-геморагічні та виразкові пошкодження у епітеліальному бар'єрі органів травлення можуть ускладнюватися кровотечами [6, 12, 43, 52], які важко діагностувати у тварин у короткий термін експерименту макроскопічним обстеженням органів. З огляду на такі обставини, ми вивчали зміни гематокриту. Найсуттєвіші зміни у вмісті гематокриту (рис. 3.12) виникали під час блокування біосинтезу сірководню після введення PAG, коли виявляли його зменшення в середньому на 10-11% ($P < 0,05$), на противагу дії СНН (в межах 5%, $P < 0,05$) порівняно до показників контрольної групи ($46,20 \pm 0,84$). Застосування під час індукції стресу корекції NaHS спричиняло збільшення гематокриту порівняно до тварин, яким індукували стрес і вони отримували плацебо (1,0 мл 0,9% розчин NaCl).

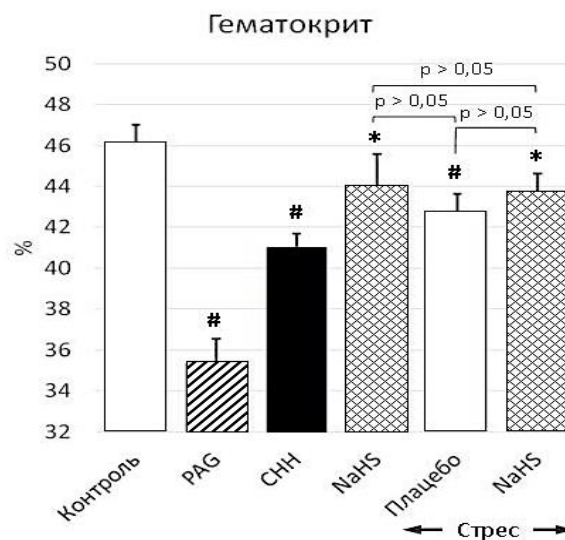


Рис. 3.12. Зміни гематокриту за умов моделювання утворення сірководню впливом пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг/добу, в/о) і натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) та за індукції стресу; $M \pm m$; $n=5$; * $P < 0,05$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Ми перевірили, як змінюється активність цитокінової регуляції, важливого компоненту взаємодії імунної та нейро-гуморальної системи, що залучені в патогенез різних форм ГЕРХ і також можуть бути

біомаркерами проявів захисних реакцій в організмі. Одночасно зі змінами бар'єрної функції СОС вивчали вміст прозапальних цитокінів ІЛ-6 та GCP-2 на тлі стрес-індукованих пошкоджень та під дією NaHS. Нами обрано для дослідження саме ці цитокіни, оскільки вони є чутливими біомаркерами доімуного запалення, оскільки ІЛ-6 – первинний прозапальний цитокін, що активує функції тканини навколо себе, GCP-2 – вторинний запальний цитокін, що має властивості хемоатрактильного хемокіну спеціального призначення (аналог ІЛ-8) і спрямовує до вогнища запалення лімфоцити та лейкоцити з крові, що циркулюють в кровоплинні [103, 218, 219, 221].

Середнє значення вмісту ІЛ-6 у щурів контрольної групи становило $29,66 \pm 0,58$ пг/мл, які прийнято нами за “умовну норму”. Модифікація вмісту ендogenous сірководню призвела до змін цитокінової секреції. Зокрема, під час блокування утворення сірководню вилученням CSE-шляху біосинтезу H_2S вміст ІЛ-6 збільшувався у більшій мірі – до 26% ($37,50 \pm 2,27$ пг/мл, $p < 0,05$), ніж якщо гальмували активність H_2S/CBS системи (веденням СНН), коли вміст був майже однаковим ($31,06 \pm 1,26$ пг/мл) з показниками тварин контрольної групи (рис. 3.13). Виявлено, що введення донора H_2S розчину NaHS зменшувало вміст ІЛ-6 порівняно до групи контролю ($P < 0,05$). За індукції стресу вміст ІЛ-6 перевищував на 80% контрольні значення, тоді як попереднє введення NaHS зменшувало вміст ІЛ-6 у середньому на 28% порівняно до показників контрольної групи.

Таким чином, застосування NaHS виявляло протизапальний ефект, який враховуючи дані гістологічного досліджень, ГІУ, зміни гематокриту можна трактувати як цитопротекторний вплив у протидії стрес-індукованим пошкодженням стравоходу, що виникає унаслідок зменшення проульцерогенних вазотропних змін, що мають визначальне значення для бар'єрної функції СОС.

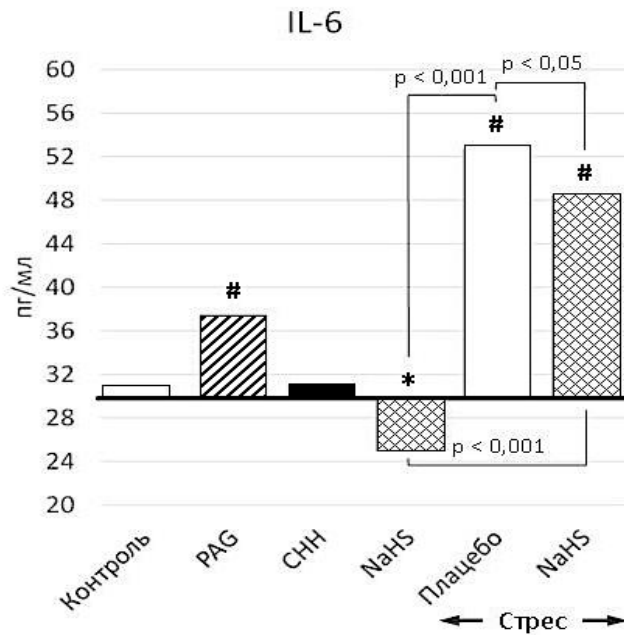


Рис. 3.13. Вплив модифікації вмісту сірководню за умов застосування пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг/добу, в/о) і натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) та індукції стресу на вміст ІЛ-6 (пг/мл); $M \pm m$; $n=5$; * $P < 0,05$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Вміст хемокіна GCP-2 (рис. 3.14), регулятора хемотаксису різних типів лейкоцитів, що використовується для оцінювання стану імунної реактивності [271], під час введення PAG різко збільшувався в 1,8 раза, тоді як СНН – на 30% ($P < 0,05$) порівняно до показників контрольної групи $7,746 \pm 0,229$ пг/мл, які прийняли за “умовну норму”. Вміст GCP-2 за умов застосування NaHS зменшувався до $5,778 \pm 0,582$ пг/мл ($P < 0,05$), а у щурів з експериментальним стрес-асоційованим езофагітом після попереднього введення такого засобу зменшувався до $9,796 \pm 0,527$ пг/мл (на 25% менше порівняно до тварин, що отримували плацебо, $P < 0,05$).

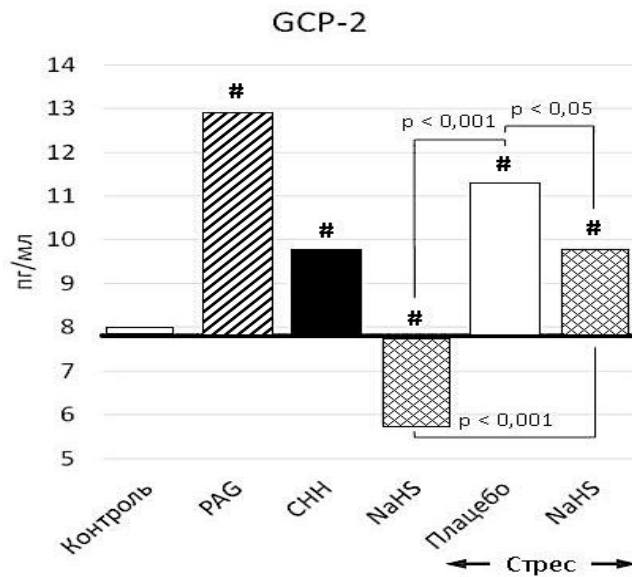


Рис. 3.14. Зміни вмісту GCP-2 (пг/мл) у сироватці крові за умов застосування пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), карбоксиметилгідроксиламін геміхлориду (СНН; 3 ммоль/кг/добу, в/о) і натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) та індукції стресу (пг/мл); $M \pm m$; $n=5$; $*P < 0,05$; $\#P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Отримані результати захисних реакцій за умов модифікування синтезу сірководню свідчать, що H_2S відіграє вирішальну роль, оскільки виконує роль сигнальної молекули, що забезпечує початкову локальну відповідь, як ініціацію запалення, вазодилатацію, покращення локального кровоплину, збільшення секреції HCO_3^- [239]. За даними літератури такі ефекти можна трактувати як захисний вплив, що супроводжуються зменшенням експресії адгезивних молекул, ознак хемотаксису, набряку, руйнування СОС [230, 295, 296]. Введення NaHS зменшувало чутливість щурів до цитоагресивної дії стресу, про що свідчило зменшення деструктивних пошкоджень СОС, набряку та лейкоцитарної інфільтрації, а також зменшення прозапальних цитокінів IL-6 та GCP-2 у сироватці крові.

Висновки до розділу

1. Таким чином, проведені дослідження показали, що застосування хімічного впливу тетрахлорметану зумовлює розвиток експериментального неерозивного езофагіту, що може бути співвідносною моделлю неерозивного езофагіту на тваринах, а газовий медіатор H_2S відіграє важливу роль для бар'єрної функції стравоходу.

2. Використання гібридної сполуки H_2S -напроксену, що містить додаткову активну групу, яка є донором H_2S , зменшує ознаки деструктивних пошкоджень у стравоході порівняно до дії класичного напроксену.

3. Гіперглікемія, що сприяє зменшенню біодоступності субстрату для забезпечення балансу у редокс-системі, у поєднанні з гальмуванням H_2S/CSE і H_2S/CBS систем біосинтезу H_2S ініціює руйнування цілісності епітеліального бар'єру у стравоході, підвищує сприйнятливність до цитоагресивного впливу та стимулює механізми, що посилюють розвиток запалення та зменшує вміст протизапальних цитокінів, і може використовуватись для моделювання неерозивного езофагіту в експериментальних дослідженнях.

4. Застосування донора сірководню $NaHS$ опосередковує підтримку цілісності епітеліального бар'єру СОС за рахунок вазотропного ефекту та обмеження запалення, збільшуючи вміст протизапального $IL-10$, а отже може бути способом посилення імунної відповіді на дію ульцерогенних чинників.

5. Дослідження адаптаційно-компенсаторних властивостей СОС за умов індукції стресу показало важливу роль H_2S у забезпеченні бар'єрної функції стравоходу. Введення $NaHS$ зменшувало чутливість щурів до розвитку стрес-асоційованих пошкоджень стравоходу, про що свідчило зменшення маси стравоходу, ознак руйнування СОС та підепітеліального набряку, а також зменшення вмісту прозапальних цитокінів $IL-6$ та $GCP-2$.

6. Отримані результати дозволяють покращити розуміння механізмів формування змін бар'єрної функції стравоходу, що є в генезі захворювань

стравоходу, що асоційовані з порушенням синтезу сірководню та оптимізувати засади їх профілактики та лікування.

Результати власних досліджень розділу 3 викладені в статтях [2, 130, 290], апробовані на наукових форумах [4, 65, 131, 288, 290, 294] та впроваджені у наукову роботу та навчальний процес у викладання дисципліни “Фізіологія” у вищих медичних закладах України (див. додаток А).

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ СІРКОВОДНЮ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ СТРАВОХОДУ ЗА УМОВ ДІЇ УЛЬЦЕРОГЕННИХ ЧИННИКІВ І ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ГІБРИДНИХ СІРКОВМІСТНИХ СПОЛУК НАПРОКСЕНУ І АЦЕТИЛСАЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ

У четвертому розділі представлено дослідження значення сірководню для бар'єрної функції стравоходу за умов модифікації синтезу ейкозаноїдів, у поєднанні з модифікацією каталітичної активності H_2S/CSE системи та введенням донора утворення сірководня $NaHS$, які отримано під час експериментального моделювання медикаментозних ушкоджень стравоходу на тваринах, що адекватні до морфо-функціональних ознак медикаментозного езофагіту у людини (англ.: pill esophagitis, drug-induced esophageal disorders) [102, 115, 120, 122, 132, 176, 266]. Відомо також, що саме NSAIDs спричиняють ерозивно-геморагічні ускладнення, які можуть мати життєвонебезпечні наслідки (перфорація, кровотеча тощо) або порушення проліферації [101, 173, 234, 253]. Серед численних захворювань стравоходу медикаментозний езофагіт – патологія, що пов'язана з впливом лікувальних препаратів (доксациліну, тетрацикліну, алендронату, NSAIDs тощо) і часто описується як неерозивний або рефрактерний езофагіт [235, 242]. Оскільки, сучасні наукові дані та наші попередні дослідження показали, що одним з ключових чинників цитопротекторних реакцій у травній системі є сірководень, вплив якого виявляються виразними протизапальними та судиннотропними властивостями за умов індукції пошкоджень, ішемії-реперфузії [100, 102, 107, 135, 157, 257] та взаємодією з системою синтезу ейкозаноїдів [114], NO та NO-синтаз [140, 144] та редокс-балансу [158, 205, 228], нашим наступним етапом досліджень стало вивчення стану бар'єрної та захисної функцій СОС за умов екзогенного введення донорів H_2S та у поєднанні H_2S з NSAIDs (H_2S -NSAIDs), що представляють групу інновативних гібридних сірковмісних сполук,

створених шляхом введення функціональних груп, здатних вивільнювати H_2S , у структури відомих лікувальних засобів [139, 161, 164, 217]. Ми вважали, що такий спосіб порівняння ефектів H_2S -NSAIDs до класичних немодифікованих NSAIDs аналогів дасть можливість зрозуміти роль H_2S у цитопротекторних та виразкозагоювальних механізмах СОС, які формують бар'єрну функцію стравоходу і допоможе зробити припущення про доцільність подальших доклінічних та клінічних досліджень H_2S -NSAIDs. Дослідження сполук H_2S -NSAIDs проводять у багатьох наукових лабораторіях, серед яких найбільший доробок належить J.W. Wallace (2007-2017) [94, 96, 146, 247-250, 255, 259], тому для вивчення нами обрано препарати H_2S -напроксен (H_2S -N, АТВ 346, рис.2.1) і H_2S -аспірин (H_2S -ASA, АТВ-340, рис.2.2), розроблені його дослідницькою групою.

З огляду на такі обставини метою даного етапу роботи було дослідити вплив H_2S на чутливість слизової оболонки стравоходу до дії ульцерогенних чинників після введення гібридних H_2S -асоційованих сполук напроксену і ацетилсаліцилової кислоти експериментальним способом в умовах спотворення природних захисних реакцій після блокування утворення сірководню та зміни активності СОХ.

4.1 Порівняльні дослідження впливу сірководню на бар'єрну функцію та адаптаційно-компенсаторні властивості слизової оболонки стравоходу та місця переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка за умов медикаментозного езофагіту, індукованого напроксеном та H_2S -напроксеном

Враховуючи, що ключовим каталітичним ензимом синтезу H_2S є CSE, активність якого блокується PAG, вивчення особливостей впливу H_2S у сполуках з NSAIDs у порівнянні до ефектів класичних немодифікованих NSAIDs аналогів на захисні властивості та бар'єрну функцію СОС проводили за умов гальмування H_2S /CSE системи біосинтезу сірководню.

4.1.1. Макроскопічна та мікроскопічна характеристика цілісності слизової оболонки стравоходу після реалізації впливу пропаргліцину, NaHS, модифікації природнього синтезу ейкозаноїдів і H₂S-напроксену

Під час обстеження слизової стравоходу у щурів, яким вводили напроксен упродовж 9 днів, виявлено макроскопічні ознаки змін, що співвідносні з М ступенем пошкоджень стравоходу (гіперемія, набряк, рихлість поверхні СОС) порівняно до даних контрольної групи з ступенем N (нормальна слизова, відсутність видимих уражень СОС) за рекомендаціями міжнародної наукової номенклатурної групи Vevey, 2011, та градацією Лос-Анджелівської класифікації [168, 275]. Під час гістологічного дослідження виявлено ознаки хронічного езофагіту, що характеризувалися альтерацією поверхневого сквамозного епітелію, втратою кератину, розпушенням епітелію і злуцненням його у просвіт стравоходу (рис. 4 А-С).

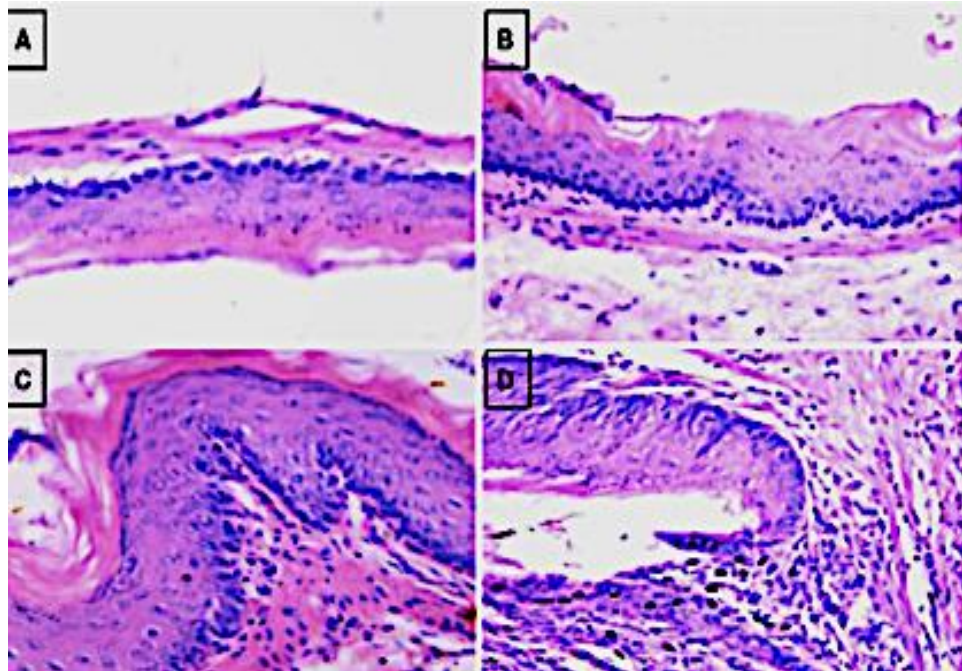


Рис. 4.1. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів у верхній (А), середній (В), нижній (С) третинах стравоходу та в місці його переходу в кардіальну частину шлунка (D) за умов впливу напроксену (30 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, в/о), фарбування Г/Е, х 400.

Також виявлено потовщення підепітеліальних структур у нижній третині та утворення папілів (епітеліальні випини, що нагадують своєрідні “складки”). Також у зрізах нижньої третини стравоходу виявлено внутрішньоепітеліальну інфільтрацію мононуклеарними лейкоцитами (рис. 4 С, D).

В умовах вилучення H_2S/CSE системи біосинтезу сірководню під час макроскопічного обстеження на СОС виявлено пошкодження типу А, що характеризувались появою вогнищевих крововиливів на тлі гіперемії. Під час гістологічного дослідження встановлено виразні цитолітичний та вазотропний ефекти РАГ, що характеризувались злуцненням поверхневого епітеліального шару, утворенням підепітеліального набряку, потовщенням базальної мембрани, дезорганізацією підслизової основи, появою поодиноких мікротромбів, периваскулярного діapedезу у субепітеліальних стромальних структурах (рис 4.2 А-С) порівняно до тварин контрольної групи, в яких зміни СОС були відсутні. Зміни місця переходу стравоходу у кардіальну частину шлунка характеризувалась геморагіями та дезорганізацією підслизової основи, включно з м'язовою пластинкою та набряком епітеліальної пластинки (рис. 4.2 D) унаслідок порушення ендотелійзалежного розслаблення [9, 88, 252].

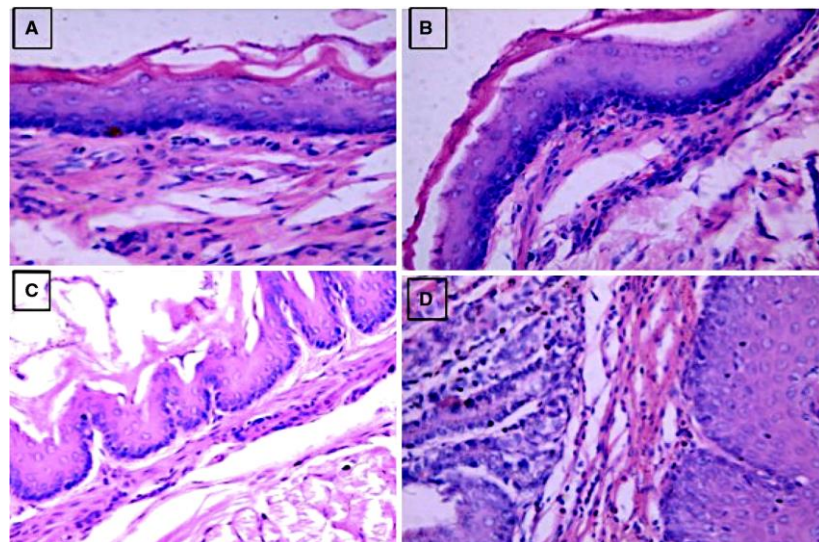


Рис.4.2. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів у верхній (А), середній (В), нижній (С) третинах та місця переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка (D) за умов впливу напроксену (30 мг/кг/добу,

упродовж 9 днів, в/о) після введення пропаргілгліцину, фарбування Г/Е, х 400.

Ранжування пошкоджень СОС за стандартами візуально-аналогової шкали виявило (рис. 4.3), що вилучення синтезу сірководню викликало зміни СОС, які відповідали ГІУ $6,600 \pm 0,547$. Поєднання напроксенового-езофагіту з нестачею H_2S призвело до збільшення ГІУ удвічі порівняно до тварин з езофагітом і природньою біодоступністю H_2S ($P < 0,01$).

Наші результати показали, що введення неорганічного донора синтезу сірководню натрію гідрогенсульфіду щурам з напроксеновим-езофагітом суттєво нівелювало ознаки пошкоджень, які за ГІУ були вдвічі меншими, ніж у тварин без корекції ($P < 0,01$) та втричі меншими порівняно до щурів, яким застосовували вилучення природнього синтезу сірководню введенням PAG ($P < 0,01$).

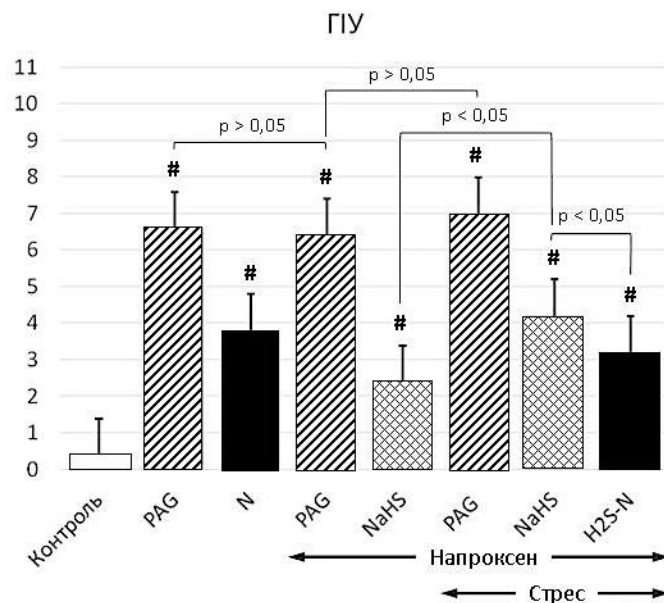


Рис. 4.3. Гістологічний індекс ураження за умов моделювання напроксен-індукованого езофагіту (30 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*) та після впливу пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о), застосування H_2S -напроксену (H_2S-N ; 14,5 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*) та індукції стресу; $M \pm m$; $n=5$; * $P < 0,05$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Активування природного синтезу сірководню введенням NaHS спричиняло зменшення цитолітичного впливу зміни активності COX та виявлялось у збереженні цілісності епітеліального бар'єру, наявності нерегулярного підепітеліального набряку (рис. 4.4 А-С) та помірної внутрішньоепітеліальної інфільтрації мононуклеарними клітинами та місця переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка (рис.4.4 D).

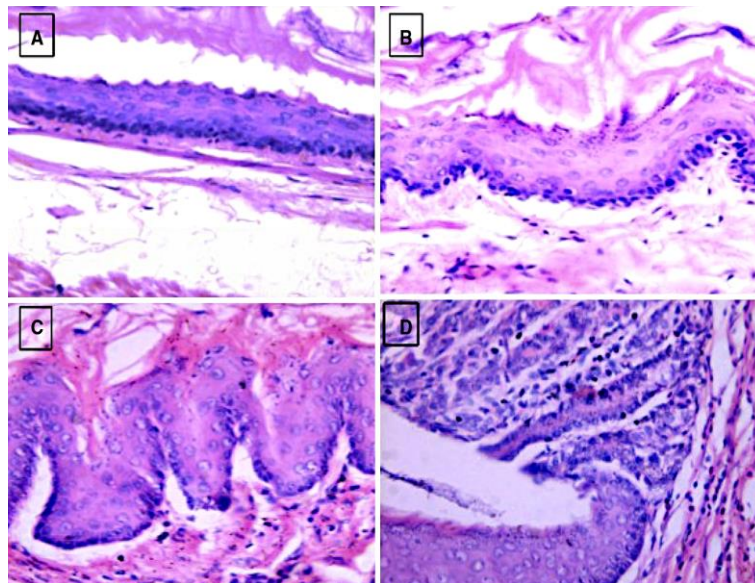


Рис. 4.4. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів з напроксен-індукованим езофагітом (30 мг/кг/добу, упродовж 10 днів, в/о) за впливу натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) у верхній (А), середній (В) та нижній (С) третинах стравоходу та нижньо-стравохідному з'єднанні (D); фарбування Г/Е, х 400.

Для дослідження ролі сірководню у адаптаційно-компенсаторних властивостях СОС ми застосовували індукцію стресу на тлі вилучення H_2S/CSE системи біосинтезу H_2S , що призвело до змін, які характеризувалися втратою кератину, роз'єднанням епітеліальної пластинки від підепітеліальних структур (рис. 4.5 А), десквамацією епітелію у просвіт стравоходу, утворенням суцільного підепітеліального набряку (рис. 4.5 В), інтенсивною внутрішньоепітеліальною інфільтрацією та геморагіями (рис. 4.5 С), ознаками запалення та дезорганізації структурних компонентів

підслизової основи рис. 4.5 D) та збільшенням ГІУ до $7\pm 0,71$ ($P < 0,01$ порівняно до тварин контрольної групи).

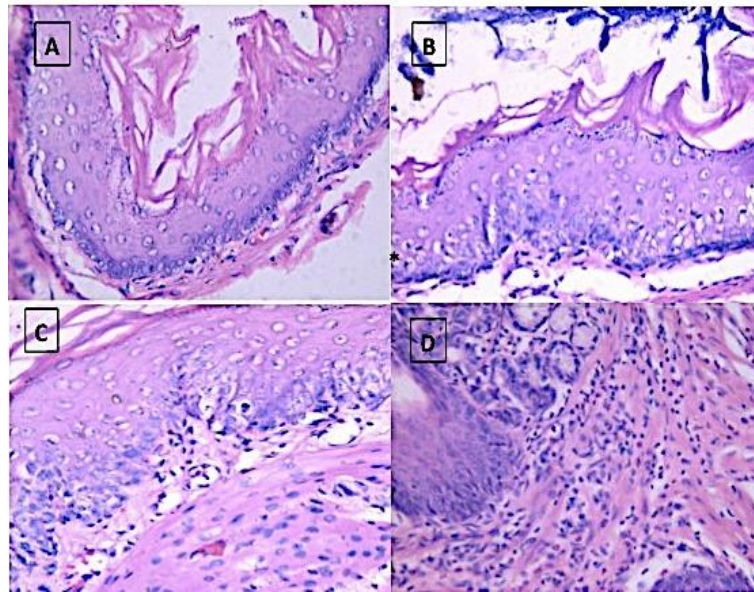


Рис. 4.5. Вплив стресу на гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів з напроксен-індукованим езофагітом (30 мг/кг/добу, упродовж 10 днів, *per os*) після введення пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о) у верхній (A), середній (B) та нижній (C) третинах та в місці переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка (D); фарбування Г/Е, х 400.

Під час вивчення змін гематокриту у всіх групах щурів після введення пропаргілгліцину виявлено відмінності у вмісті гематокриту (рис. 4.6) з найсуттєвішим зменшенням показника до 20% у щурів з напроксен-індукованим езофагітом у поєднанні з індукцією стресу $35,2\pm 0,84$ ($P < 0,01$ порівняно до контролю). Це може вказувати на появу більш інтенсивних геморагічних змін у інших відділах епітеліального бар'єру травної системи.

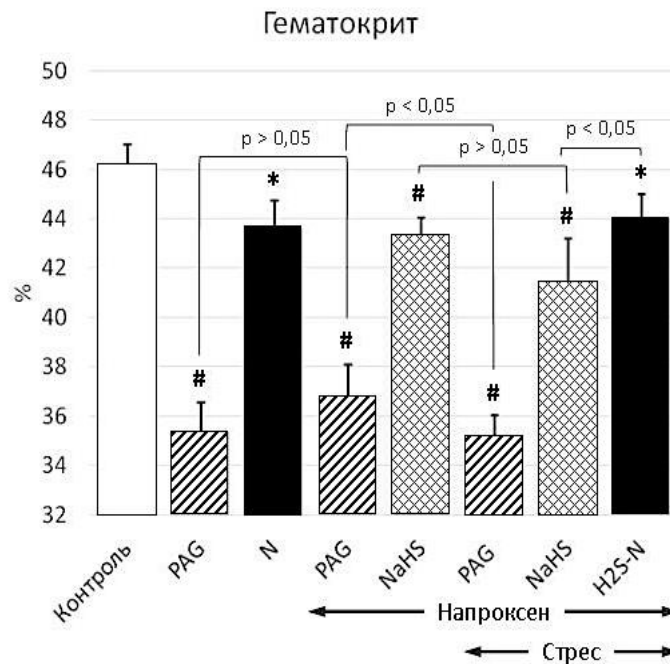


Рис. 4.6. Зміни гематокриту за умов моделювання утворення сірководню дією пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о) і натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о), застосування напроксену (N; 30 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*), H₂S-напроксену (H₂S-N; 14,5 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*) та індукції стресу; $M \pm m$; $n=4-5$; * $P < 0,05$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Вивчення впливу сполук, що є донорами синтезу сірководню NaHS на прояви напроксен-індукованого езофігіту і гібридного H₂S-асоційованого напроксену (H₂S-N) впродовж 9 днів, у поєднанні з індукцією ВІС, показало під час гістологічного аналізу СОС їхній виразний езофагопротекторний вплив (рис. 4.7). У щурів з введенням неорганічного донора NaHS відсутні генералізовані дефекти цілісності епітеліальної пластинки, мікротромби та гемодинамічні розлади у субепітеліальних структурах, міжепітеліальний набряк був меншим (рис. 4.7 А, D), що може вказувати на ефективну вазодилататорну дію H₂S, яка нівелювала цитодеструктивний вплив, асоційований зі стресом. Це також підтверджено змінами вмісту гематокриту, зменшився в межах 10% ($P < 0,01$) у порівнянні до показників контрольної групи, тоді як за вилучення H₂S/CSE системи біосинтезу H₂S

зміни гематокриту сягали зменшення понад 20% від показників контрольної групи. Застосування H_2S-N призвело до зменшення ознак альтерації та запалення у СОС, структури строми були збережені у більшій мірі, також відсутні ознаки застою та периваскулярного діapedезу, потовщення базальної мембрани (рис. 4.7 В), дезорганізація м'язового шару в ділянці переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка (рис. 4.7 С).

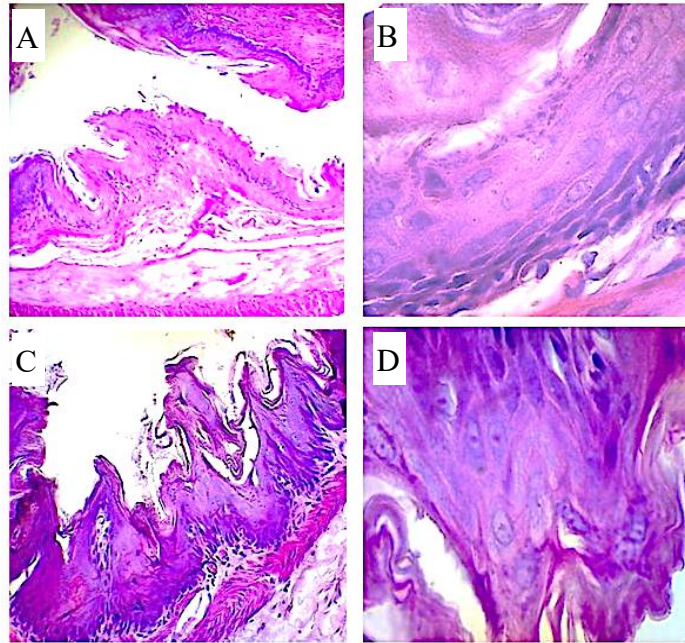


Рис. 4.7. Вплив стресу на гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів з напроксеновим езофагітом після введення натрію гідрогенсульфіду ($NaHS$; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) (А, D) та за умов використання H_2S -напроксену (14,5 мг/кг/добу, упродовж 10 днів, *per os*) під час стресу (В, С); фарбування Г/Е, х 400.

Ми вважаємо, що даний ефект можливо обумовлений впливом сірководню на активування ендотелій-опосередкованого вазодилататорного впливу через збільшення його біодоступності, що за даними наукової літератури призвело до обмеження цитолітичних ефектів, викликаних стресом і порушенням циклу арахідонової кислоти за циклооксигеназним метаболічним шляхом [229-231, 261, 264, 269].

4.2. Спрямованість протизапальних реакцій за вмістом інтерлейкіну-6 і цитокіну GCP-2 за умов моделювання NSAIDs-асоційованої езофагопатії та зміни біосинтезу сірководню

Відомо, що застосування модифікування біосинтезу сірководню може модулювати стан захисних реакцій, які реалізуються через численні сигнальні шляхи [114, 122, 216, 230]. Вміст IL-6 та GCP-2 змінюється за умов порушення функціонального балансу в складній системі локального та системного нейро-гуморального контролю. Для визначення особливостей дій H_2S та з'ясування механізмів їх реалізації вивчали зміни вмісту IL-6 та GCP-2 в умовах дослідження адаптаційно-компенсаторних реакцій бар'єрної функції стравоходу, коли для моделювання напроксен-асоційованої езофагопатії використовували класичний та гібридний H_2S -напроксен та поєднання з індукцією стресу (рис 4.8).

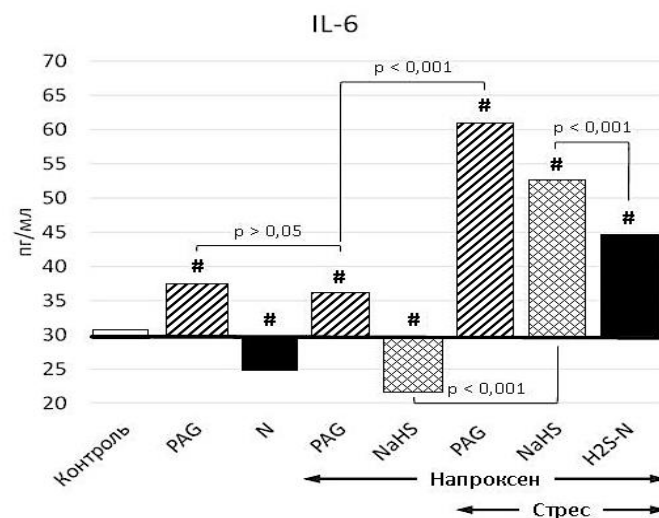


Рис. 4.8. Вміст IL-6 (пг/мл) у щурів з медикаментозним езофагітом за умов модифікації біосинтезу сірководню після введення пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о) та індукції стресу на тлі застосування напроксену (N; 30 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*) або H_2S -напроксену (H_2S -N; 14,5 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*); $M \pm m$; $n=5$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

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) порівняно до результатів групи контролю, які прийнято за «умовну норму» ($P < 0,01$). Після введення PAG та індукції стресу на 9-й день експерименту щурам, що щодня отримували попередньо напроксен, вміст IL-6 сягав $60,87 \pm 1,11$ пг/мл, що майже у 2 рази був більшим порівняно до тварин, що не зазнали стресу ($P < 0,01$).

Такі прояви прозапальних реакцій можуть свідчити про активну участь H_2S/CBS системи біосинтезу H_2S у цитопротекції та адаптаційно-компенсаторних пзахисних реакціях, що виявляються в активуванні проявів доімунного запалення, а саме експресії адгезивних молекул, міграції лейкоцитів у тканини [230] за умов спотворення його утворення.

Під час застосування введення NaHS у щурів з напроксеновим езофагітом виявлено зменшення вмісту IL-6 до 30% порівняно до значень у контрольній групі, які прийнято за “відносну норму” ($P < 0,01$), і за умов індукції стресу до $52,31 \pm 1,09$ пг/мл ($P < 0,01$) у порівнянні до групи тварин, яким застосовували лише введення PAG. Оскільки, важливим пусковим механізмом зміни бар'єрної функції є структурно-функціональна дезорганізація клітин СОС, що виникає унаслідок порушення активності СОХ та дисбалансу між продукцією активних форм кисню й антиоксидантною системою для їх протидії, ми визначали вміст IL-6 під час введення H_2S-N у поєднанні з стресом. Результати досліджень показали, що H_2S-N зменшував вміст IL-6 удвічі порівняно до дії PAG та на 30% порівняно до дії NaHS ($P < 0,01$), виявляючи езофагопротекторну дію у кращій мірі, ніж класичний аналог напроксен (рис. 4.8).

Відомо, що хемокін GCP-2 є найбільш спорідненим з нейтрофільним аттрактантом-78 і зміни його вмісту можуть допомогти дослідити ранні прояви порушень захисних реакцій. Проведення порівняльного аналізу вмісту GCP-2 під час експериментального напроксенового езофагіту,

індукованого класичним NSAIDs та гібридною формою H₂S-NSAIDs, може стати основою для з'ясування значення сірководню в бар'єрній функції стравоходу, цитопротекції СОС, молекулярних механізмів реалізації їхнього впливу та впровадження у практику більш безпечних ліків. Динаміка змін вмісту GCP-2 показала (рис. 4.9), що зменшення утворення H₂S після застосування гальмування H₂S/CBS системи його біосинтезу спричиняло збільшення вмісту цього хемокіну до 12,92±1,01 пг/мл у порівнянні до даних контрольної групи (P<0,01), тоді як у тварин з експериментальним напроксеновим езофагітом – у 1,5 рази у порівнянні до даних контрольної групи (P<0,01). Причиною таких результатів щодо вмісту GCP-2 є протизапальний вплив NSAIDs, що одночасно вказує на важливу роль біодоступності сірководню для реалізації протизапального впливу.

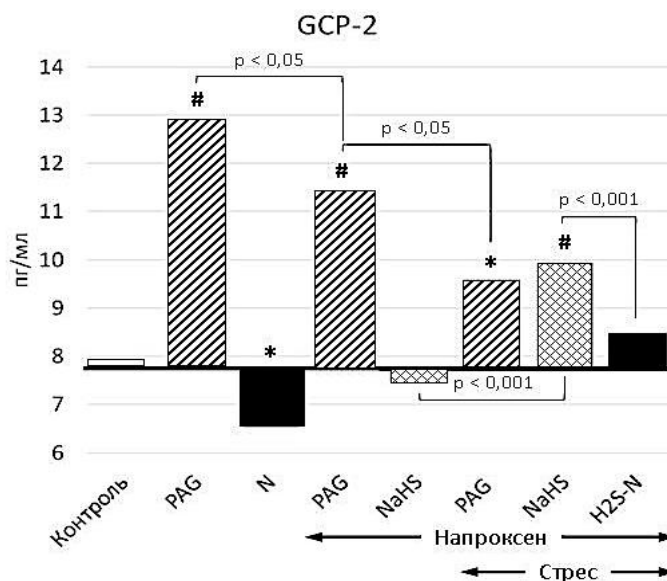


Рис. 4.9. Характеристика вмісту GCP-2 у щурів за експериментальної NSAIDs-асоційованої езофагопатії під час застосування напроксену (N; 30 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*), модифікації біосинтезу сірководню після введення пропаргілгліцину (PAG; 25 мг/кг/добу, в/о), натрію гідрогенсульфіду (NaHS; 100 мкмоль/кг/добу, в/о), H₂S-напроксену (H₂S-N; 14,5 мг/кг/добу, упродовж 9 днів, *per os*) та у поєднанні з гострим стресом $M \pm m$; n=5; *P<0,01, #P<0,01 відносно показників у контрольній групі.

Зниження вмісту GCP-2 після введення сполуки H₂S-напроксену (АТВ-340) відбулось у більшій мірі (8,464±0,342 пг/мл), ніж під час разового введення NaHS у щурів з напроксеновим езофагітом (9,938±0,579 пг/мл), що може свідчити про виразний езофагопротекторний ефект АТВ-340 за рахунок вивільнення сірководню, що нівелювало цитолітичні ефекти за рахунок неселективного блокування активності COX.

Оскільки, зміни бар'єрної функції СОС і прояви запалення нерозривно пов'язані між собою, зменшення синтезу прозапальних цитокінів за умов збільшення синтезу сірководню після введення NaHS та H₂S-напроксену є додатковим свідченням доцільності подальшої розробки та опрацювання новітніх безпечних H₂S-похідних NSAIDs.

4.3 Визначення чутливості СОС щурів до розвитку експериментальної NSAIDs-асоційованої езофагопатії за впливу аспірину і H₂S-аспірину

Порушення циклу арахідонової кислоти за умов застосування інгібіторів COX, якими є NSAIDs, є відомим чинником порушення цілісності бар'єрної та змін моторно-евакуаторної функцій, локального кровопостачання органів травлення, виділення факторів росту, агрегації нейтрофілів, синтезу прозапальних медіаторів, сірководню та поліамінів [222, 252]. Відомо, що ацетилсаліцилова кислота (аспірин, ASA) має позитивний профілактичний вплив у пацієнтів з дисплазією стравоходу [223, 269], однак про зміни у СОС за умов експериментальних досліджень *in vivo* із застосуванням аспірину та гібридної H₂S-похідної форми аспірину (H₂S-ASA) невідомо. Оскільки ефекти впливу ASA та H₂S-ASA на СОС за умов різної тривалості не вивчалися попередньо, важливо було оцінити дію сірководню під час їхнього разового та тривалого застосування. Тому, наступним завданням наших досліджень стало визначення чутливості СОС щурів до розвитку експериментальної NSAIDs-асоційованої езофагопатії під час використання аспірину та сполуки H₂S-аспірину, що поєднує властивості донора H₂S та протизапальну дію, за умов разового та впродовж 9-и денного введення.

Дослідження макроскопічних змін СОС за Лос-Анджелівською класифікації патоморфологічних характеристик захворювань стравоходу [168, 275] в умовах разового використання ASA та H₂S-ASA та за 9-ти денного введення H₂S-ASA показало, що слизова оболонка стравоходу відповідає критеріям ступеню N, що характеризується відсутністю змін і звичайним блідо-рожевим кольором слизової оболонки. У щурів, яким застосовували 9-ти денне введення ASA, виявляли ознаки змін СОС, які характеризувалися як ступінь M (гіперемія та пастозність поверхні слизової оболонки).

Гістологічні дослідження показали, що за умов разового введення аспірину пошкодження поверхневого шару СОС було менш виражені, ніж зміни у підслизовій основі. Виявляли потовщення базальної пластинки та лейкоцитарну інфільтрацію епітелію СОС (рис. 4.10 а), тоді як за введення H₂S-ASA такі ознаки були відсутні та в більшій мірі відповідали СОС тваринам групи контролю (рис. 4.10 б).

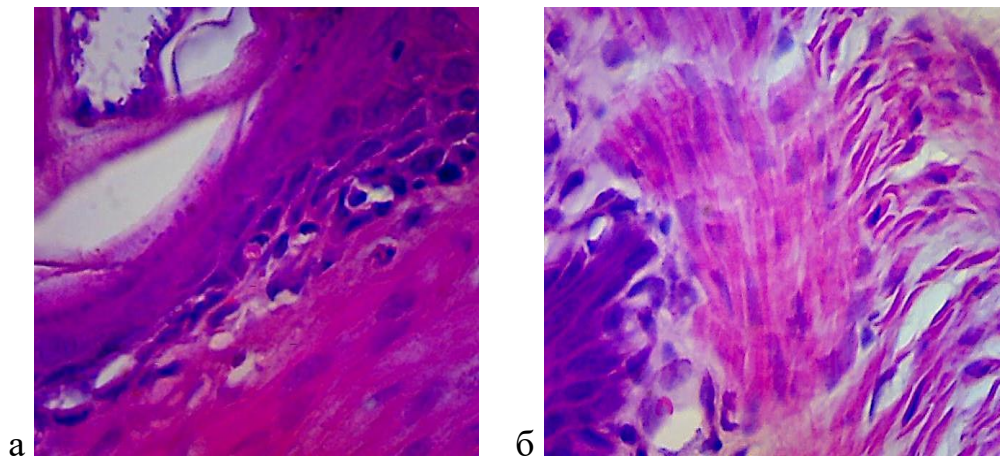


Рис. 4.10. Гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов введення аспірину (а) у дозі 10 мг/кг/добу, *per os* та H₂S-аспірину (б) у дозі 17,5 мг/кг/добу, *per os*.

Відомо, що поєднання впливу стресу та ульцерогенної дії NSAIDs супроводжується потенціюванням ефектів і є широко визнаним способом дослідження бар'єрної та захисної функцій епітеліального бар'єру органів

травлення. Макроскопічне дослідження СОС після індукції стресу у тварин, що отримували ASA упродовж 9 днів, характеризувалися інтенсивною суцільною гіперемією та набряком, що відповідало критеріям ступеня М, тоді як за використання H_2S -ASA ознаки гіперемії та набряку були присутні, проте їхня інтенсивність була меншою, що співвідносне з критеріями ступеня М за Лос-Анджелівською класифікацією патоморфологічних характеристик захворювань стравоходу [210]. Гістологічні дослідження засвідчили, що за умов поєднання неселективного гальмування COX введенням ASA та індукції стресу виникає посилення деструктивних пошкоджень СОС (рис. 4.11), які характеризувалися руйнуванням епітеліальної пластинки, у деяких випадках до базальної мембрани, геморагіями, сланджом та тромбоутворенням (рис. 4.11 а), зоною набряку, реорганізацією компонентів підслизової основи (рис. 4.11 б).

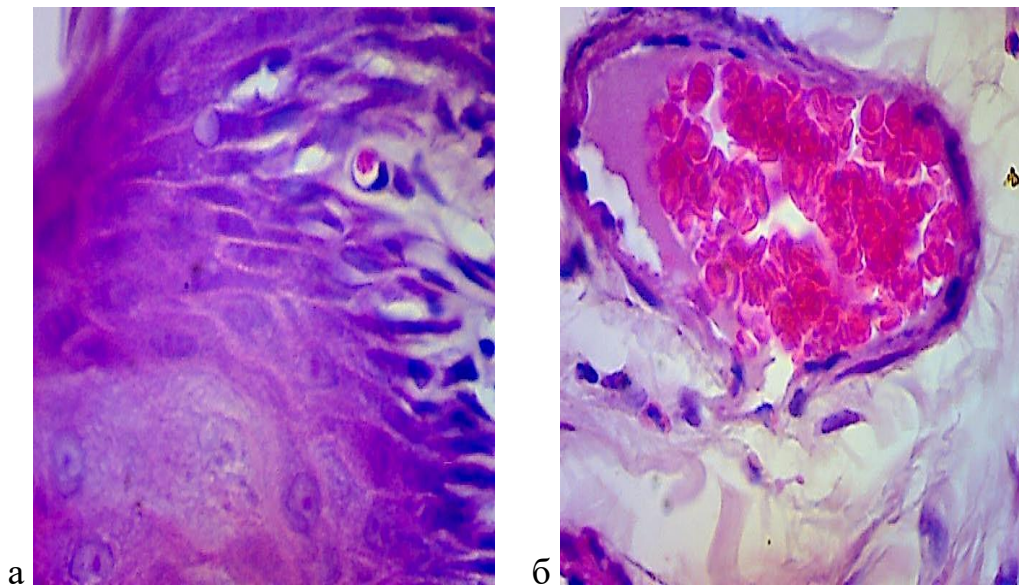


Рис. 4.11. Вплив стресу на гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов введення аспірину (10 мг/кг/добу, 9 днів *per os*).

Застосування стресу у тварин, які упродовж 9 днів отримували H_2S -ASA спричинило зменшення деструктивних пошкоджень СОС, а саме меншим утворенням характерних папілів. Переважали дрібні поодинокі

пошкодження, як помірне розпушення епітеліальної пластинки, нерівномірний набряк та поодинокі тромбоутворення у підслизовій основі СОС (рис. 4.12 а, б).

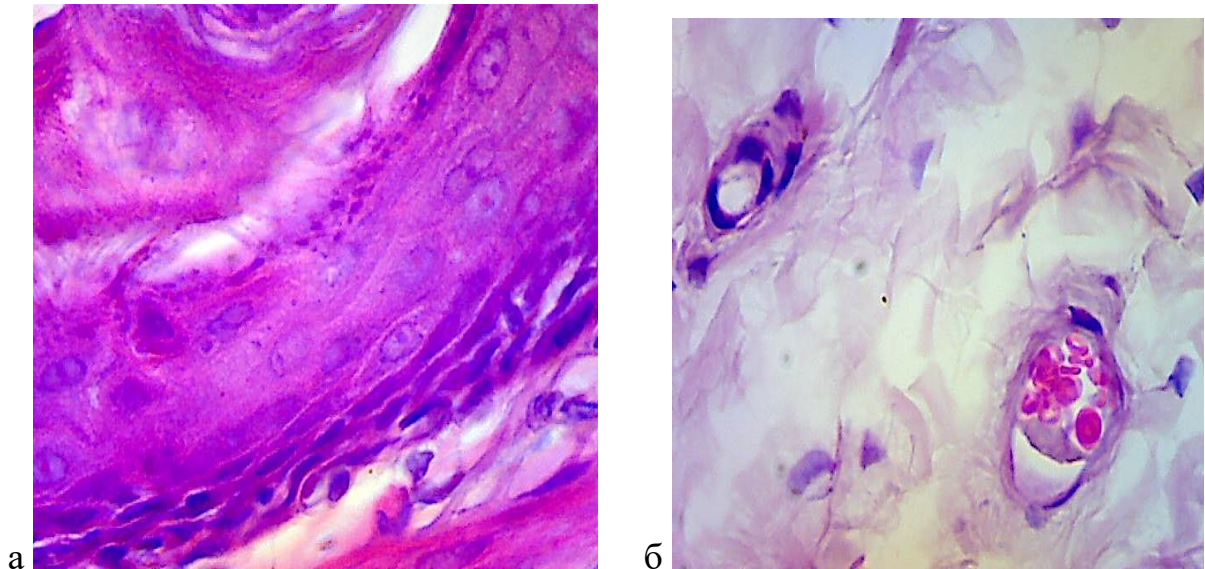


Рис. 4.12. Вплив стресу на гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов введення H_2S -аспірину (17,5 мг/кг/добу, 9 днів per os).

Ефект сумісної дії стресу та АТВ-340 упродовж 9 днів характеризувався зменшенням лейкоцитарної інфільтрації, набряку (рис.4.13) та ознак деструкції СОС (рис. 4.14).

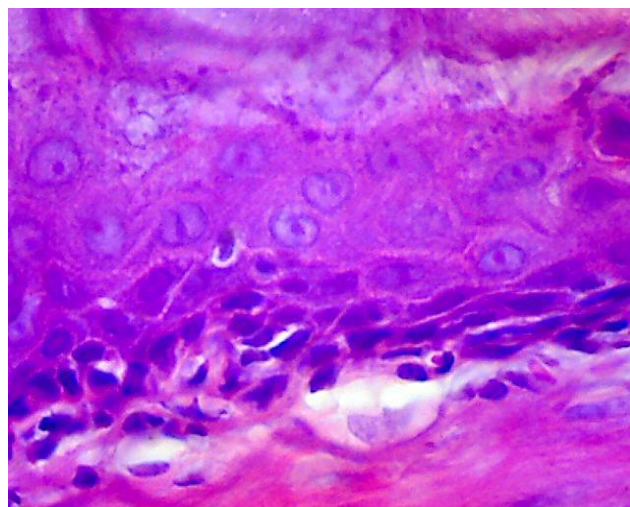


Рис. 4.13. Вплив стресу на гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов введення H_2S -аспірину (17,5 мг/кг/добу, 9 днів per os).

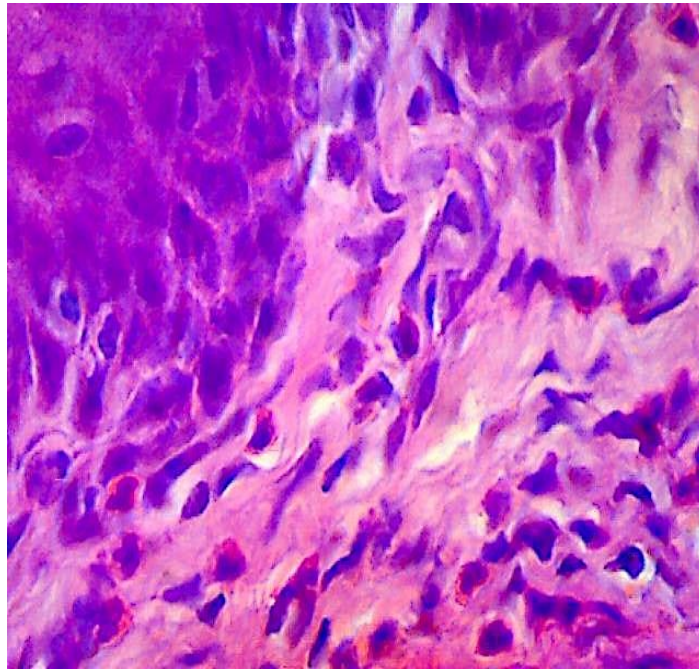


Рис. 4.14. Вплив стресу на гістологічні зміни слизової оболонки стравоходу щурів за умов введення H_2S -аспірину (17,5 мг/кг/добу, 9 днів *per os*).

Оскільки, відомо, що ульцерогенна дія стресу та засобів, вплив яких ґрунтується на гальмуванні COX, реалізується у вазотропних пошкодженнях [232], а дія H_2S -асоційованих похідних – на ендотеліально-опосередкованих ефектах, ми з’ясували як змінюється маса стравоходу (рис. 4.15). Так, застосування тривалого введення ASA (упродовж 9 днів) спричинило збільшення маси на 20% порівняно з контрольними значеннями ($4,98 \pm 0,71$ г/100 г), натомість дія H_2S -ASA характеризувалась показниками, які не відрізнялась від групи контролю ($P < 0,05$) та відносно показників групи з 9-денним введенням ASA.

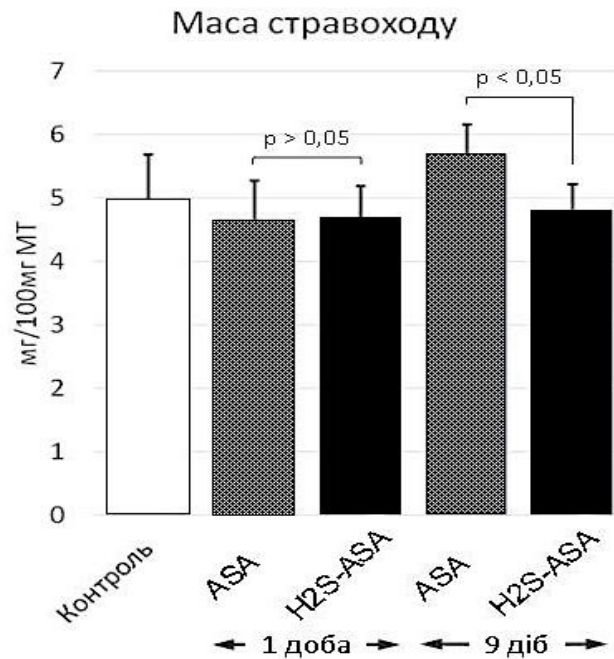


Рис. 4.15. Відносна маса стравоходу щурів за умов різного терміну введення аспірину (ASA, 10 мг/кг/ добу та упродовж 9 діб, *per os*) та H₂S-аспірину (H₂S-ASA, 17,5 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*), $M \pm m$; $n=5$; $P < 0,05$.

Враховуючи дані аналізування гістологічних змін СОС, для стандартизації пошкоджень нами обраховано ГІУ у тварин різних експериментальних груп (рис. 4.16). Виявлено вплив різної тривалості класичного та гібридного асоційованого з сірководнем аспірину був залежним від тривалості введення, так за умов 9-ти денного застосування ГІУ СОС відповідав $5 \pm 0,71$, що майже у 2 рази був збільшений порівняно до даних ГІУ СОС під час одноразового введення ($P < 0,01$ порівняно до показників контролю). Комбінований вплив стресу з аспірином за умов різного терміну застосування гальмування активності СОХ мав однаковий характер, що виявлявся двократним збільшенням ($P < 0,01$), тоді якщо використовували гібридної сполуки АТВ-340, H₂S-ASA упродовж 9 днів, то зміни ГІУ практично не відрізнялися від значень, отриманих під час разового введення H₂S-ASA ($P < 0,01$, порівняно зі значеннями контрольної групи) і разом з тим ГІУ слизової оболонки стравоходу був у 2 рази меншим, ніж під час дії класичного ASA ($P < 0,001$).

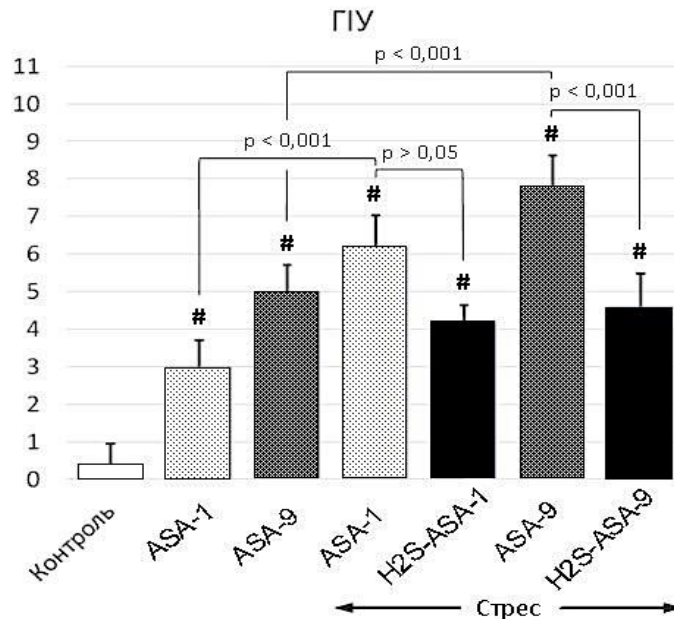


Рис. 4.16. Гістологічний індекс ураження СОС щурів за умов моделювання аспіринового-езофагіту введенням аспірину (ASA, 10 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*) та H₂S-аспірину (H₂S-ASA, 17,5 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*), M±m; n=5; #P<0,01 відносно показників у контрольній групі.

Оскільки ефекти різної тривалості застосування (разового та впродовж 9-и діб) проульцерогенного впливу класичної та модифікованої форми аспірину (ASA і H₂S-ASA, відповідно) на СОС не вивчались попередньо, важливим було дослідити також зміни гематокриту. Враховуючи дані про генералізовану проульцерогенну дію класичних немодифікованих NSAIDs, ми вважали за необхідне порівняти вплив збагачених сірководнем аналогів H₂S-NSAIDs з класичними за з'ясуванням особливостей змін показників гематокриту в умовах поєднання з індукцією стресу (рис. 4.17), що є експериментальним стандартом у дослідженнях ульцерогенної дії. Так, після разового введення класичного препарату ASA показники гематокриту змінювались не суттєво (до 10%), тоді як поєднання тривалого застосування та індукції стресу спричиняло зменшення на 25% (37,00±1,00) порівняно з контрольними значеннями (P<0,01). Натомість, якщо застосовували H₂S-ASA,

то суттєві зміни значень гематокриту відсутні порівняно до показників групи контролю ($P < 0,05$; рис. 4.16).

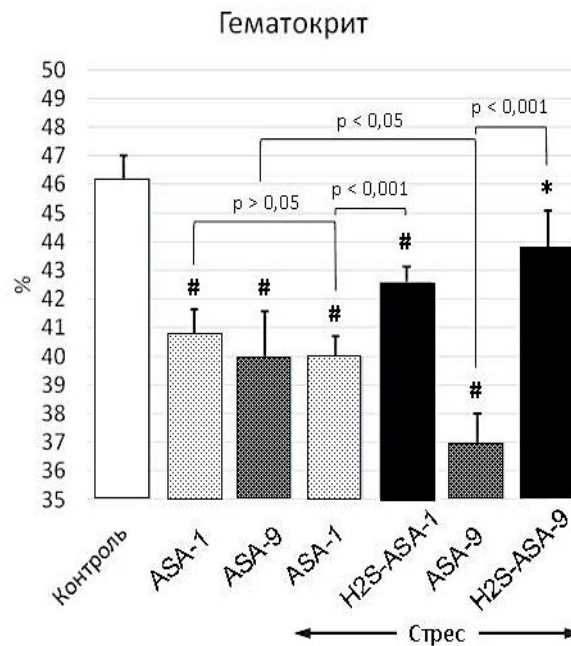


Рис. 4.17. Значення гематокриту у щурів за умов моделювання аспіринового-езофагіту введенням аспірину (ASA, 10 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*) та H_2S -аспірину (H_2S -ASA, 17,5 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*), $M \pm m$; $n=5$; * $P < 0,05$; # $P < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Такі результати опосередковано підтверджують генералізований цитопротекторний ефект за рахунок вивільнення сірководню з гібридної слолуки АТВ-340 (H_2S -аспірину), що забезпечує бар'єрну функцію СОС і відсутність потенційних деструктивних пошкоджень у інших відділах епітеліального бар'єру органів травлення, нівелюючи добре досліджений у численних наукових лабораторіях вплив збільшеної кількості прозапальних простагландинів та лейкотрієнів [6, 7, 203, 204].

4.4. Дослідження значення сірководню на захисні, адаптаційно-компенсаторні та інтегративні властивості СОС у різні терміни застосування класичної та гібридної H_2S -ацетилсаліцилової кислоти

З наших попередніх досліджень та даних літератури відомо, що у відповідь на формування деструктивних змін у епітеліальному бар'єрі стравоходу розпочинається запальна реакція, яка відбувається за участі прозапальних цитокінів (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF), що синтезуються у ділянці порушення структурно-функціональної цілісності і сприяють міграції лейкоцитів саме у вогнище запалення і продукуванню вільних радикалів та хемокінів [218, 226, 241]. У свою чергу, новоутворені вільні радикали та хемокіни індукують локальні захисні реакції, зумовлені збільшенням вивільнення газотрансмітерів NO, H_2S та CO, а також експресію адгезивних молекул, міграцію епітеліальних клітин до інтерстицію тощо. Ми припустили, що для вивчення ролі сірководню в цитопротекції СОС необхідно вивчити ознаки експериментального езофагіту, індукованого проульцерогенною дією немодифікованих NSAIDs аналогів (аспірину) та стресом у порівнянні з дією аналогічної субстанції, що завдяки збагаченню структури функціональними групами, здатними вивільнювати H_2S (напр., гібридних NSAIDs, асоційованих з сірководнем, H_2S -NSAIDs) у аспекті дослідження вмісту цитокінів IL-6 та GCP-2. Такий засіб може володіти кращою терапевтичною активністю, виявляючи властиву H_2S вазотропну і протизапальну активності, що сприятимуть зменшенню побічної цитолітичної дії унаслідок гальмування COX і синтезу прозапальних простагландинів та лейкотрієнів.

Нами встановлено, що ефекти разового введення ASA та 9-денного впливу ASA були відмінними (рис. 4.18), оскільки тривале введення впродовж 9 діб сприяло зменшенню вмісту IL-6 до $24,81 \pm 1,05$ пг/мл, що на 15% менше порівняно до показників групи контролю ($P < 0,05$). Дослідження захисних реакцій за умов разового та тривалого застосування ASA та H_2S -ASA без та з індукцією стресу мали практично однакову спрямованість.

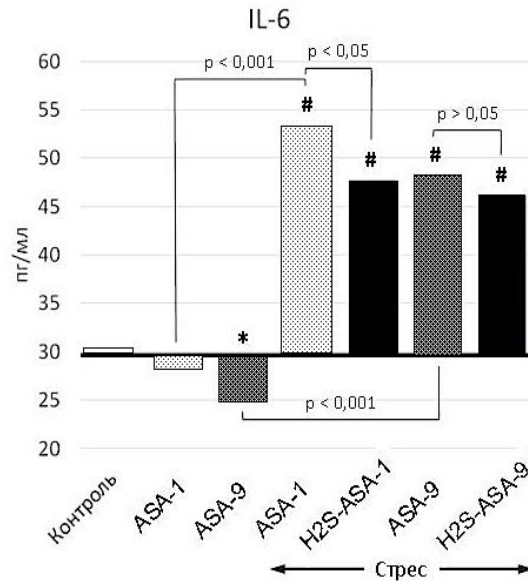


Рис. 4.18. Вміст ІЛ-6 у щурів за умов моделювання аспіринового-езофагіту введенням аспірину (ASA, 10 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*) та H₂S-аспірину (H₂S- ASA, 17,5 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*), M±m; n=5; #P<0,01 відносно показників у контрольній групі.

В обох серіях досліджень H₂S-ASA виявляв виразну протизапальну дію, зменшуючи вміст ІЛ-6 на 25% під час поєднання проульцеронної дії стресу та гальмування активності COX (разове введення) в порівнянні до значень групи, яким вводили класичний аспірин (53,37±4,31 пг/мл, P<0,05) і на 15%, якщо індукували стрес після дев'ятикратного введення засобу (48,32±2,68 пг/мл, P<0,001; порівняно до групи контролю).

Вивчення впливу сірководню на динаміку захисних реакцій за змінами вмісту GCP-2 у щурів з аспіриновим-езофагітом під час введення класичного аспірину та H₂S-аспірину показало, що застосування тривалого введення аспірину спричинило збільшення вмісту хемокіну до 10,10±0,95 пг/мл, що на 35% більше відносно «умовної норми» результатів групи контролю (P<0,01).

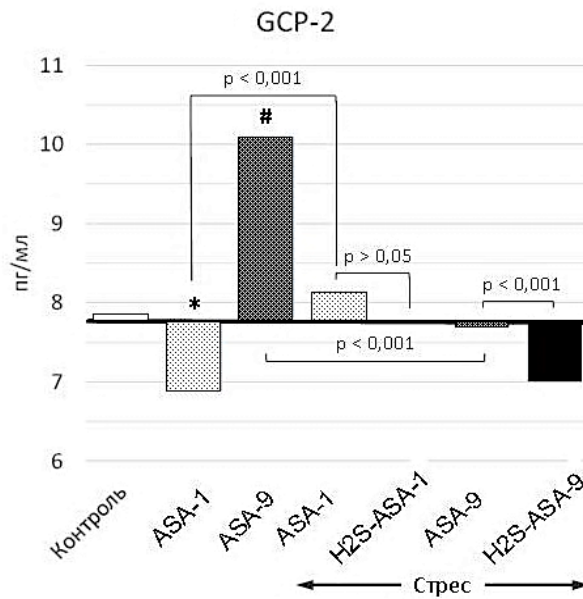


Рис. 4.19. Вміст GCP-2 у щурів за умов моделювання аспіринового-езофагіту введенням аспірину (ASA, 10 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*) та H₂S-аспірину (H₂S-ASA, 17,5 мг/кг/добу та упродовж 9 діб, *per os*), M±m; n=5; #P<0,01 відносно показників у контрольній групі.

Використання одноразового введення H₂S-ASA у поєднанні з дією стресу не вплинуло на вміст GCP-2, який був аналогічним до показників у контрольній групі (P>0,05), тоді як дія ASA збільшила незначно вміст хемокіну до 8,140±0,223 пг/мл (P<0,01 порівняно до даних щурів, яким не індукували стрес). Порівняння стану захисних реакцій в умовах поєднання тривалого введення упродовж 9-и діб ASA і H₂S-ASA та індукції в останній день стресу показало, що вплив H₂S-ASA супроводжувався протизапальною дією у більшій мірі, ніж за впливу ASA і за значеннями наближався до вмісту GCP-2 у щурів з аналогічним введенням ASA (P<0,001).

Отже, збільшення кількості введень ASA сприяє збільшенню проявів прозапальних реакцій, тоді як застосування H₂S-ASA не виявляло тенденції до інтенсифікації запалення.

Таким чином, донор синтезу сірководню суттєво послаблював проульцерогенну дію неселективної зміни активності COX. Результати

нашого дослідження захисних реакцій та адаптаційно-компенсаторних реакцій за вмістом IL-6 та GCP-2 підтверджуються даними морфофункціонального аналізу стану СОС за умов індукції неерозивного езофагіту застосуванням NSAIDs та H₂S-NSAIDs. Ми виявили, що запальні реакції та ульцерогенна дія H₂S-ASA є меншими порівняно до ефектів, що індукує ASA. Наші результати дозволяють припустити, що протизапальна, антиоксидантна, антиадгезивна та цитопротекторна дії H₂S можуть залучатися у ефекти H₂S-ASA та пояснити генез езофагопротекторної дії H₂S-ASA. Такі дані можна використати у перспективі застосування H₂S-ASA в якості безпечного засоба для профілактики малігнізації стравоходу Барретта [223, 224].

Висновки до розділу 4

1. Дослідження адаптаційно-компенсаторних реакцій бар'єрної функції стравоходу в умовах введення H₂S-NSAIDs дало можливість зрозуміти роль H₂S у цитопротекторних та виразкозагоювальних механізмах СОС і зробити припущення про доцільність подальшого доклінічного та клінічного вивчення таких сполук.

2. Запропоновані моделі експериментального медикаментозного езофагіту, як напроксеновий- та аспіриновий-езофагіт, демонструють особливості впливу NSAIDs на бар'єрну та захисну функції стравоходу. Інтенсивність змін функціонального стану слизової оболонки стравоходу щурів у різні терміни після введення напроксену та H₂S-напроксену, ацетилсаліцилової кислоти та H₂S-ацетилсаліцилової кислоти та за умов комбінованого впливу стресу та NSAIDs дозволяє стверджувати про важливу роль сірководню у бар'єрній функції стравоходу за рахунок цитопротекторного впливу.

3. Порівняльна характеристика впливу сірководня на показники цитокінової секреції за умов введення індукції медикаментозного езофагіту введенням напроксену та H₂S-напроксену, ацетилсаліцилової кислоти та H₂S-

ацетилсаліцилової кислоти та за умов комбінованого впливу стресу та NSAIDs показала, що вміст IL-6 та GCP-2 має прогностичну цінність для використання як неінвазивний маркер пошкоджень СОС.

Результати власних досліджень розділу 4 викладені в статтях [3, 15, 63, 246, 286], апробовані на наукових форумах [61, 62, 64, 65, 131, 190, 191, 283-285] та впроваджені у наукову роботу та навчальний процес у викладання дисципліни “Фізіологія” у вищих медичних закладах України (див. додаток А).

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Гастроентерологічна патологія займає значне місце серед внутрішніх захворювань [42, 226]. Не дивлячись на значний прогрес у розумінні етіопатогенезу, широкий арсенал діагностичних, лікувальних ресурсів і досягнень фармакології, епідеміологічні дослідження свідчать, що найпоширенішими гастроентерологічними захворюваннями у теперішній час є хвороби стравоходу, що можуть бути як самостійна нозологія, коморбідний стан або гостра чи хронічна ятрогенна патологія [1, 3, 11, 24, 36, 39, 54, 57, 80, 235].

Нещодавно запропонована класифікація гастроентерологічних хвороб в β -версії Міжнародної класифікації хвороб-11 (МКХ-11), яка ще обговорюється експертами та медичним науковим товариством, є більш удосконаленою, включає як функціональні, так і органічні розлади, ґрунтується на етіологічних факторах і рекомендує класифікувати захворювання відповідно до гістологічних ознак, оскільки ризик розвитку аденокарциноми стравоходу залежить від ступеня запалення СОС та кишкової метаплазії, що розвивається за умов стравоходу Барретту [40, 45, 60, 116, 129, 277].

З огляду на такі обставини, важливим є розуміння механізмів, що забезпечують бар'єрну функцію слизового бар'єру в стравоході та можуть бути основою для протидії пошкодjuвальному впливу фізіологічного рефлюксу, що виникає під час спонтанної релаксації нижнього стравохідного сфінктеру, газоутворення, швидкого кліренсу шлункового вмісту, який закидається у стравохід, та запобігання потрапляння рефлюксату в ороларинго-фарингеальні відділи травної та дихальної системи, спричиняючи екстраезофагальні форми ГЕРХ [115].

У генезі розвитку захворювань стравоходу важливе значення мають механізми, що забезпечують захисні властивості епітеліального бар'єру. Згідно

літературних даних сучасної експериментальної та клінічної гастроентерології й фармакології вони залежать від генетичних (напр., нейром'язова дисфункція, фіброз стравоходу) та епігенетичних (напр., ожиріння, нездорове харчування, цукровий діабет II типу, побічна дія ліків), розладів функціонування ентеричної нервової системи, а також змін, які виникають під час вагітності, старіння, травматичних ушкоджень тощо [80, 90, 295]. За даними клінічних досліджень езофагіти, стриктури, метаплазії та рак стравоходу відносять до нозологій, що пов'язані зі слизовою стравоходу (англ.: mucosal diseases). Результати провідних наукових дослідницьких центрів вказують на характерну особливість проявів неерозивного езофагіту (так званого мікроскопічного езофагіту), що виявляється за допомогою гістоморфологічних досліджень біопсійного матеріалу стравоходу, високовартісних спеціальних ендоскопічних досліджень, як хромоендоскопії, ендоскопії зі збільшенням зображення з високим розрішенням та ендоскопію з посиленням зображення разом з його збільшенням за допомоги новітніх оптичних та відеовізуальних технологій, що дозволяють верифікувати прояви, характеру і тривалість хронічного запалення, щоб класифікувати за розширеними Лос-Анджелівськими та Esohisto критеріями [79, 86, 92, 116]. Саме тому, дослідження в експериментах нових аспектів механізмів забезпечення бар'єрної функції стравоходу, що реалізують захист від виразкоутворення та особливості загоєння у СОС в аспекті впливу газового трансміттера сірководню, до якого прикута увага, починаючи з піонерних досліджень Kimura H., 2001 та інших численнях наукових груп [114, 117, 125, 128, 134, 140, 204, 205, 228], допоможуть з'ясувати найперші зміни у функціонуванні стравоходу, які важко дослідити в клінічних дослідженнях [220].

Останнім часом багато інформації з'являється про фізіологічне значення сірководню як газового трансміттера, що разом з іншими газовими трансміттерами СО та NO відіграє важливу роль в цитопротекції органів травлення, а саме гастро-, ентеро- та васкулопротекторних ефектах [135, 184, 177, 200], проте стосовно впливу на бар'єрну функцію та виразкозагоєння

СОС у науковій літературі на даний час – недостатньо. Тому, метою наших досліджень було вивчення ролі H_2S у цитопротекторних властивостях СОС, що є актуальним питанням сучасної гастроентерології, оскільки саме ступінь хронічної запальної реакції в організмі є ключовим фактором для метапластичного трансформування СОС та появи стравоходу Барретта [119, 197, 269, 273]. Відомо, що, розвиток “німого езофагіту” за рахунок зміненої ноціцепції, коли відбувається «маскування» хвороби та відсутня адекватна діагностична та лікувальна тактика та може спричинити порушення проліферації та функціональну плейотронну канцерогенезу [50, 158]. Таким чином, враховуючи роль H_2S для органів травлення ноціцепції, дослідження фізіологічних складових механізмів цитопротекції СОС з окресленням ролі сірковмісних сполук має практичне значення, оскільки дозволить розширити розуміння природних захисних та інтегративних механізмів, що у свою чергу, допоможе оптимізувати, як діагностичні, так і лікувальні засади для езофальних захворювань. Враховуючи численні дослідження, присвячені вивчення сірковмісних сполук, які вказують на їхню важливу роль цитопротекції, а застосування донорів для їх біосинтезу (напр., $NaHS$), що за даними досліджень mRNA гальмують активність $COX-2$, $iNOS$, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $HIF-\alpha$, головних біомаркерів цитолізу для епітеліального бар’єру органів травлення [87, 88, 234, 270], з’ясування механізмів їхньої дії або збагачених H_2S -асоційованих сполук матиме прикладне значення.

У контексті викладеного ми вважали доцільним розглянути можливість створення моделі пошкодження цілісності СОС на тваринах (від англ.: animal model), яка б була співвідсною за проявами гістоморфологічних ознак з захворюваннями стравоходу у людей, за допомогою модифікації природнього біосинтезу H_2S . Про доцільність даної гіпотези свідчать дані про прямий вплив сульфгідрильних груп на цитопротекцію слизової оболонки дванадцятипалої, а також товстої кишки [214, 233, 234], коли застосування блокаторів їхньої біодоступності хімічними сполуками, похідними цистеаміну, що використано в експериментальній моделі Szabo S.,

1978, для індукції гострої та хронічної пептичної виразки в дванадцятипалій кишці, що добре відтворюється і широко вживається в експериментальній гастроентерології. Згідно з літературними даними головним наслідком нестачі сірководню, важливої сигнальної молекули численних міжклітинних та внутрішньоклітинних процесів, є порушення локального кровопостачання через розвиток ендотеліальної дисфункції [267], хронічного запалення [230], регулювання біоенергетичних функцій мітохондрій унаслідок зменшення біодоступності сірковмісних сполук, що викликає підвищену інтенсивність утворення вільнорадикальних сполук, зниження продукції АТФ, зменшення активності антиоксидантного захисту, розвитку гіпоксії [157, 239]. Водночас, встановлено за даними Dombkowski R.A., 2011, що гіпоксія – важливий гуморальний сенсорний чинник рухової гастроінтестинальної діяльності, яка сприяє порушенням злагодженої роботи моторно-евакуаторного та сфінктерного апарату органів травлення [84], а отже порушувати необхідні фізіологічні умови для підтримки бар'єрної функції органів травлення.

У нашій роботі для опрацювання моделі неерозивного езофагіту на тваринах нами обрано хімічний цитолітичний спосіб за допомогою CCl_4 , який широко використовується в експериментальній медицині та токсикології для індукції гострого та хронічного гепатиту та фіброзу печінки. Нами виявлено, що цитотоксична дія CCl_4 , індуктор руйнівного оксидативного стресу для клітинних та субклітинних структур в організмі, у поєднанні з впливом напроксену, неселективного блокатора активності COX, здатна викликати ознаки неерозивного пошкодження СОС, що співвідносні з критеріями мікроскопічного езофагіту згідно класифікації Esohisto, 2009-2011 [131]. Було показано, що поєднана цитоагресивна дія CCl_4 та NSAIDs, неселективного блокатора COX, напроксену виявила потужніший руйнівний вплив на епітеліальний бар'єр, ніж одинарна тетрахлорметану, оскільки встановлено повну деструкцію структур підслизової основи, що створюють так званий “гемодилуційний бар'єр”, індукуючи геморагічні зміни в СОС, набряк епітеліальної пластинки, мікротромби та руйнування м'язової

пластинки. Такий вплив можна пояснити цитолітичною дією на сірковмісні сполуки та цитопротекторні ейказаноїди, що відіграють важливу роль у процесах збереження цілісності епітеліального бар'єру стравоходу. Наші дані доповнюють інші експериментальні роботи, в яких було показано, що токсична дія CCl_4 спричиняє виражену запальну реакцію, що підтверджується експресією прозапальних цитокінів [73].

Проведене у даній роботі дослідження іншої гібридної сполуки NSAIDs – H_2S -напроксену, що володіє поєднаною протизапальною активністю NSAIDs та ангіокринною дією H_2S , показувало цитопротекторний вплив на СОС, що виявлявся у зменшенні ГІУ, зменшенням ознак руйнування як епітеліальної пластинки, так і мязової пластинки й підслизових структур, а першу чергу, вазотропного компонентів. Таким чином, отриманий ефект езофагопротекторний ефект H_2S -напроксену можна пояснити тим, що дана сполука, яка є донором синтезу сірководню, що за даними літератури виявляє гастропротекторну та ентеропротекторну дії під час індукції стресу, ішемії-реперфузії та впливу NSAIDs, а також спроможна покращувати локальний кровоплин та активність розчинної гуанілциклази (sGC/gGMP) [87, 195, 198]. Враховуючи наші отримані результати, можна стверджувати про важливість сірковмісних сполук для формування цитопротекторних реакцій СОС. Слід зазначити, що спосіб індукції неерозивного езофагіту за допомогою поєднання цитоагресивної дія CCl_4 та напроксену, можливий для використання з урахуванням усіх необхідних застережних заходів для експериментаторів. На наш погляд, враховуючи виразні езофагопротекторні властивості H_2S -напроксену за умов хімічно індукованого ульцерогенезу за рахунок властивостей H_2S модифікувати синтез мембранотропних ейказаноїдів, важливо дослідити його вплив на адаптаційно-компенсаторні властивості СОС за умов стрес-опосередкованого ульцерогенезу.

Наступним способом індукції неерозивного езофагіту ми обрали моделювання стану ендогенної токсемії метаболічного генезу, що супроводжувалася надмірною продукцією кінцевих продуктів

глікозилювання, логічним наслідком чого згідно даних літератури є створення умов для ульцерогенезу в СОС, проявів хронічного (млявого) запалення, появи кишкової метаплазії або порушень проліферації у стравоході [167, 170, 244, 295]. Нашу увагу привернув спосіб індукції пре-метаболичного синдрому за довготривалого висококалорійного високовуглеводного харчування [143], що індукує збільшення активності індубельної NO-синтази (NOS), iNOS, та одночасного спотворенням активності ендотеліальної NOS (eNOS), що за даними наукових груп Склярва О.Я., 2008-2017 [29, 117] може або підвищувалась як компенсаторна відповідь, або за даними Takeuchi K, 2012-2015 [238, 239], Magierowski M., 2015 [155] – знижуватись та викликати ендотеліальну дисфункцію. Враховуючи, що природні газові трансміттери NO і H₂S та їх каталітичні біорегулятори взаємодіють (NO-H₂S) в індукції запалення, змінюючи утворення простаноїдів і лейкотрієнів, а також цитокінову та хемокінову секрецію, експресію молекул адгезії ICAM та інших маркерів прозапальних реакцій, прояви порушень підслизової основи можуть виникати унаслідок залучення NO-H₂S сигнальних шляхів [218]. Порушення синтезу сірководню формує ендотеліальну дисфункцію, що виявляється як наслідок дисбалансу секреції ендотеліальних факторів, що беруть участь у регулюванні гомеостазу, гемостазу (простациклінів, тромбомодулінів, фібринопептиду А, протромбіну, фактору VII) та захисних реакцій (зміни в експресії селектинів, інтегринів, адгезивних молекул ICAM) [9, 167, 196, 204, 206]. Нами встановлено, що поєднання гіперглікемії з вилученням H₂S/CSE- і H₂S/CBS- систем біосинтезу H₂S викликало руйнування бар'єрної функції стравоходу, що підтверджувалось масометричними, гістоморфологічними та імунологічними дослідженнями. Дослідження захисних властивостей за зміною секреції протизапального IL-10 та прозапального IL-17 показало прозапальну спрямованість інтерлейкінової експресії у разі обмеження біодоступності сірководню. У тварин, яким застосовували неорганічний донор синтезу H₂S для корекції цитотоксичного

впливу гіперглікемії та моделювання збільшення біодоступності в якості субстату, епітеліальний бар'єр стравоходу не зазнав руйнування, однак суттєвого зменшення вмісту IL-17 не відбулось, оскільки разове введення NaHS було недостатнім для зменшення хронічної запальної реакції, що вже розвинулась за умов HSD. Ці дані вказують на те, що принаймі 4-и тижнева гіперглікемія в поєднанні з модифікацією біосинтезу сірководню може спричинити функціональне напруження механізмів цитопротекції СОС, а корисним засобом протидії цитоагресії буде застосування сполук донорів біосинтезу сірководню в триваліший термін введення та згідно стандартів досліджень дозозалежного способу застосування.

Відомо, що одним з способів дослідження цілісності епітеліального бар'єру органів травлення є моделювання виразкоутворення та виразкозагоєння в органах травлення є індукція стрес-опосередкованих змін [10, 205, 215]. Враховуючи, здатність H_2S активувати антиоксидантні властивості, гальмувати перекисне окиснення ліпідів, а саме утворення окиснених форм, які здатні змінювати утворення NO, модифікувати синтез мембранотропних ейкозаноїдів, важливо дослідити його вплив на СОС за умов ульцерогенезу під час індукції стресу. Для цього нами було використано спосіб дослідження захисної та бар'єрної функцій стравоходу до стресу за умов модифікації біосинтезу H_2S шляхом блокування активності H_2S/CSE - і H_2S/CBS систем та введення неорганічного донора біосинтезу H_2S – NaHS в умовах індукції стресу. Розглядаючи наші результати в гістоморфологічних дослідженнях СОС встановлено, що ГІУ стравоходу щурів за умов вилучення біосинтезу H_2S після введення PAG був співвідносний з результатами тварин, яким індукували гострий стрес, проте дослідження вмісту гематокриту показало суттєвіше його зменшення у разі введення PAG порівняно до даних тварин зі стресом. Такі результати можна пояснити більш потужним руйнівним геморагічним ефектом та проульцерогенним впливом вилучення H_2S/CSE системи біосинтезу сірководню, що підтверджують дані інших дослідників [228-230]. Дослідження вмісту прозапальних IL-6 та

GCP-2 підтвердило протизапальний характер дії газового трансміттера сірководню, оскільки в умовах нестачі його біодоступності виявляли їхнє суттєве збільшення [103, 196].

Вивчення впливу введення NaHS на адаптаційно-компенсаторні властивості СОС за умов стресу показало виразний цитопротекторний вплив, який підтверджено гістоморфологічними змінами, даними гематокриту (був майже однаковий з показниками контрольної групи) та зменшенням вмісту IL-6 та GCP-2 порівняно до аналогічних показників тварин, яким індукували стрес та вводили плацебо. Низкою робіт показано, саме застосування донорів синтезу H_2S позитивно впливає на перебіг запальних реакцій у шлунку та підшлунковій залозі та товстій кишці [126, 245, 253, 254, 260]. Враховуючу протизапальну дію H_2S , можна стверджувати, що отримані нами результати вказують на езофагопротекторний та захисний вплив сірководню у разі збільшення його біодоступності.

Важливим досягненням сучасної езофагології є необхідність відокремлення ерозивно-виразкових змін СОС від неерозивного езофагіту, оскільки перебіг, клінічне значення та можливі наслідки даних нозологій є відмінними [44, 201, 227]. Відомо, що найчастіше ерозивно-виразкові зміни СОС індуковані застосуванням медикаментів, особливо ASA та NSAIDs, неселективних блокаторів COX, і згідно світових стандартів вони є основою для розвитку медикаментозного езофагіту [40]. З клінічної точки зору найбільш важлива особливість ятрогенної медикаментозної езофагопатії полягає в тому, що пацієнти, які приймають NSAIDs та мають множинні геморагії й ерозії в слизовій стравоходу або ділянці переходу стравоходу в кардіальну частину шлунка, належать до групи підвищеного ризику розвитку кровотечі [41].

У етіопатогенезі медикаментозної езофагопатії, пов'язаної з прийманням NSAIDs, залучені численні фактори ризику, серед яких важливе місце належить порушення адаптаційно-компенсаторних процесів у СОС

внаслідок неселективного гальмування COX та змін, що відбуваються у COX/PG-залежних цитопротекторних реакціях [74, 115, 167].

Нещодавно, в молекулярних дослідженнях було встановлено, що застосування NSAIDs спричиняє не лише зміни активності компонентів циклу арахідонової кислоти, а також ознаки оксидативного стресу, що супроводжується зменшенням активності компонентів циклу гуанілатциклази (сірковмісних сполук), а також взаємодією з іншими газовими трансмітерами NO і CO, які в залежності від своєї біодоступності можуть залучати інші сигнальні шляхи, що пов'язані з такими ангіогенними чинниками, як VEGFA, TGF- β , а також EGFs та відіграють важливу роль у регенерації та проліферації [51, 68, 100].

Нещодавно досліджено, що для оцінювання вазотропного компоненту цитопротекції важливо встановити роль хемокінів (хемотактичних цитокінів, CC – від англ.; chemotactic cytokines, білків 5–15 kDa), що забезпечують гомеостаз імунної системи і створюють захистні реакції у організмі господаря. Крім того, вони мають важливе фізіологічне значення в ангіогенез та онкогенезі, оскільки через взаємодію зі специфічними трансмембранними рецепторами, пов'язаними з G-білком, індукують внутрішньоклітинні сигнальні процеси, які спричиняють оксидативний “респіраторний вибух”, вивільнення ензимів із лізосом і хемотаксис [10, 15]. У залежності від позицій цистеїнових залишків виділяють дві підгрупи: CC і CXC. Від наявності або відсутності амінокислотної послідовності Glu-Leu-Arg (ELR) на N-терміналі цистеїнового залишку, у родині CXC хемокінів виділяють ангіогенні (ELR+) і ангіостатичні (ELR-) білки. Відомо, що ELR+CXC хемокіни є специфічними і необхідними активаторами нейтрофільних лейкоцитів, важливого ресурсу хемотаксису. У аспекті структурного аналізу GCP-2 – найбільш споріднений з нейтрофільним аттрактантом-78 (ENA-78)/CXCL5, похідним епітеліальних клітин (77% однакових амінокислот), а за біологічними функціями – інтерлейкіном-8 (IL-8)/CXCL8 (30% однакових амінокислот), оскільки використовують ідентичні рецептори CXCR1. Важливим вазотропним цитокіном є IL-6, високочутливий прозапальний біомаркер з плейотропним впливом, включно з участю у

розвитку метаболічних порушень, мітохондріальних змін та аутоімунних реакцій. Завдяки таким властивостям дослідження експресії GCP-2 і IL-6 допомагає комплексно оцінювати фізіологічні властивості ендотелію.

З літературних джерел відомо, що існують новітні NSAIDs, структура яких збагачена сульфургідрильними групами – H₂S-NSAIDs, що дозволяє набути гібридних властивостей, як протизапальних від основної “батьківської” сполуки, так, і вазотропних, і протизапальних ефектів за рахунок дії сірководню, що введено у сполуку [70, 139, 164]. Однак, багато спостережень стосуються застосування H₂S-NSAIDs на слизову оболонку шлунка чи товстої кишки [127, 272]. Тоді ж, як ефекти H₂S-NSAIDs на СОС носять характер окремих спостережень або не є достатньо обґрунтованими. З огляду на такі обставини, ми опрацювали модель медикаментозної напроксенової езофагопатії, використовуючи модифікування вмісту H₂S вилученням H₂S/CSE системи біосинтезу сірководню (введенням PAG) або покращення – введенням неорганічного донору NaHS або H₂S-напроксену без або в умовах індукції стресу.

В умовах поєднання напроксенового езофагіту з вилученням H₂S/CSE системи біосинтезу сірководню нами зафіксовано виразні гістоморфологічні ознаки руйнування епітеліального бар'єру, особливо підслизової основи наслідок порушення організації строми, появи мікротромбів, периваскулярного діapedезу, що негативно впливає на стан мікроциркуляторного кровопостачання. Більше того, у місці переходу стравоходу у кардіальну частину шлунку було зареєстровано геморагії, дезорганізація м'язової пластинки та набряк що вносить свій внесок у функціонування стравоходу, який згідно сучасної літератури виявляє анізотропну поведінку в міжтравний період та в постпрандіальний період, створюючи умови для трансформування фізіологічного рефлюксу у патологічний, сприяючи порушенню кліренсу стравоходу, газоутворення та зміні мікробіому СОС [124, 167, 171]. Отримані наші результати доповнюють результати експериментальних досліджень інших авторів, які свідчать про порушення моторно-евакуаторної функції стравоходу за умов нестачі сірководню [234]. Це може пояснити дані

клінічних досліджень, що вказують на появу клінічних симптомів ГЕРХ на тлі NSAIDs-індукованої медикаментозної езофагопатії, які ж в той ж час залишаються рефрактерними до стандартного лікування гальмування шлункової секреції антацидними засобами [11, 116, 181].

Наші дослідження впливу H_2S -напроксену на бар'єрну й захисні функції стравоходу, а також адаптаційно-компенсаторних властивості за умов стресу та вмісту IL-6 та GCP-2, вказують, що дана гібридна сполука може стати безпечним засобом протизапальної дії, що мала б широку сферу використання у різних галузях медичної практики, і не викликати медикаментозного езофагіту, оскільки побічний руйнівний вплив у наших дослідженнях на СОС відсутній, а також як профілактично-терапевтичний засіб для запобігання аденокарциноми стравоходу [40, 119].

Вивчення цілісності бар'єрної функції стравоходу щурів до розвитку експериментальної NSAIDs-асоційованої за умов введення ASA та H_2S -ASA дозволило встановити роль H_2S у захисних реакціях і цитопротекторних механізмах слизової оболонки стравоходу щурів за умов медикаментозної езофагопатії. На противагу дії ASA, що в умовах поєднання з впливом стресу викликала руйнування СОС, геморагії, сландж та тромбоутворенням, що верифікувалось неерозивним езофагітом з двократним збільшенням ГІУ ($P < 0,01$) та появою інтенсивного підепітеліального набряку, гібридна сполука H_2S -ASA не спричиняла деструктивних змін епітеліального бар'єру стравоходу за умов водно-іммобілізаційного стресу. Враховуючи, що зміни вмісту IL-6 та GCP-2 є тонкими біомаркерами модуляції численних сигнальних шляхів, залучених в ульцерогенез, ми перевірили рівень даних хемокінів у порівняльних дослідженнях впливу класичного та гібридного аспірину H_2S -ASA в умовах разового та 9-денного застосування.

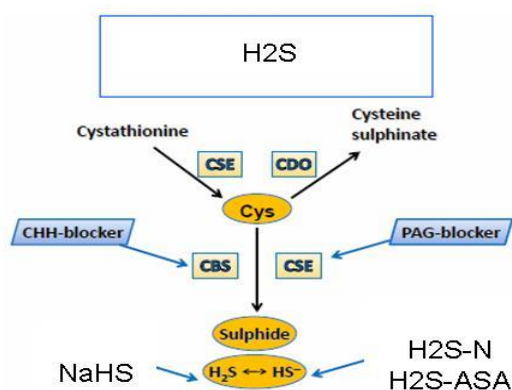


Рис. 5.1. Роль сірководню та асоційованих з ним гібридних нестероїдних протизапальних засобів у цитопротекторних властивостях слизової оболонки стравоходу. CDO – цистеїн діоксигеназа (від англ.: cysteine dioxygenase).

Ми отримали зміни, які вказують на протизапальні ефекти обох засобів, чітко вказуючи на більш ефективну дію асоційованої з гідроген сульфідом сполуки H_2S -ASA. Ми припускаємо, що такі процеси є наслідком взаємодії сірководню з метаболічною активністю антиоксидантного захисту, активуванням імунокомпетентних клітин, рекрутуванням лейкоцитів до місця запалення, а отже зменшенням чутливості СОС до впливу ульцерогенних чинників [89, 124, 230, 238, 272].

Враховуючи отримані дані, на основі проведених нами досліджень, можна стверджувати про ключову роль регуляторного газового трансміттера гідроген сульфід у захисних реакціях і цитопротекторних механізмах слизової оболонки стравоходу щурів за умов експериментального неерозивного езофагіту та медикаментозної езофагопатії, а також про значення засобів, що збільшують біодоступність

H_2S для бар'єрної та захисної функцій СОС. Посилення набряку СОС, збільшення вмісту IL-6, IL-17 та GCP після гальмування біосинтезу сірководню вказує на те, що у езофагопротекції важливу роль мають ефекти, які відбуваються за участі H_2S . Таким чином, вперше встановлено, що нестача сірководню призводить до порушення бар'єрної функції стравоходу, що підвищує сприйнятливність до запалення. Застосування гібридних H_2S -асоційованих нестероїдних протизапальних препаратів має перспективу з огляду на поєднання виразної захисної дії з відсутністю проульцерогенного впливу за рахунок залучення молекулярно-клітинні механізмів природної резистентності стравоходу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено наукове завдання про визначення ролі гідроген сульфід у механізмах цитопротекції та адаптаційно-компенсаторних реакцій СОС за індукції пошкоджень бар'єрної функції стравоходу тетрахлорметаном, гіперглікемією, блокуванням активності систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази, H_2S /цистатіонін- β -синтази та модифікації синтезу ейкозаноїдів, під час поєднання зі стресом і введенням $NaHS$, напроксену, аспірину, H_2S -напроксену та H_2S -аспірину.

1. Встановлено значення H_2S у забезпеченні цитопротекторних та адаптаційно-компенсаторних механізмів за умов порушення бар'єрної функції стравоходу застосуванням тетрахлорметану, високовуглеводного харчування, гальмуванням активності систем H_2S /цистатіонін- γ -ліази, H_2S /цистатіонін- β -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 ульцерогенних чинників

порівняно з контролем.

4. Зниження вмісту H_2S на тлі блокування активності H_2S /цистатіонін- γ -ліази, H_2S /цистатіонін- β -синтази систем за умов високовуглеводного харчування спричиняє порушення бар'єрної функції стравоходу, розвиток неерозивного езофагіту і дисрегуляцію цитокінової 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 GSP-2 – на 50% ($p < 0,001$) порівняно до тварин, що отримували плацебо.

6. Вплив H_2S -напроксену, H_2S -ацетилсаліцилової кислоти спричинив збереження цілісності слизової оболонки стравоходу та зниження чутливості до розвитку стрес-індукованих пошкоджень. Дія H_2S -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% ($p < 0,001$), GSP-2 на 50% ($p < 0,001$) у сироватці крові порівняно з тваринами, що отримували аспірин. Таким чином, гібридні H_2S -асоційовані NSAIDs чинять виразний цитопротекторний вплив на бар'єрну функцію, про що свідчить зменшення проульцерогенної активності на стравохід порівняно з класичними аналогами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бичков МА. Нестероїдні протизапальні препарати як фактор ризику виникнення патології стравоходу. Сучасна гастроентерол. 2007(6):38:59-64.
2. Була Н, Хирівська Д, Гаврилюк О, Заячківська О. H₂S-похідні нестероїдних протизапальних препаратів як нові модулятори цілісності слизової оболонки стравоходу та шлунка. Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки. 2015;41(26):53-63.
3. Була Н. Експресія GSP-2 і IL-6 як інструмент оцінки впливу гідроген сульфід-асоційованого напроксену до і після індукції стресу (експериментальне дослідження). Вісник проблем біології і медицини. 2017; 1(3):107-110.
4. Була Н. С., Хирівська Дз.Л., Гаврилюк О.М., Заячківська О.С.. Цитопротекторні впливи сірководню в умовах хронічного ураження проксимального відділу травної системи нестероїдними протизапальними препаратами (експериментальні дослідження). XIV З'їзд Всеукраїнського Лікарського Товариства та Конгрес Південно-Східно Європейського Медичного Форуму. Одеса. 2015, 9-13 вересня.
5. Гладких ФВ, Степанюк НГ. Сучасні підходи до послаблення ульцерогенності нестероїдних протизапальних засобів: досягнення, невирішені питання та шляхи оптимізації. Запорожский медицинский журнал. 2014(2):82-6.
6. Гончарук ЛМ. Судинорухова функція ендотелію при гастродуоденопатіях, індукованих нестероїдними протизапальними препаратами, у хворих на остеоартроз. 2016.
7. Гопчук ОМ. Нестероїдні протизапальні препарати у практиці акушера-гінеколога. Здоров'є жінчини. 2017(1):31-3.
8. Добровольська РА, Гошовська ЮВ, Шиманська ТВ, Сагач ВФ. Вплив різних шляхів метаболізму L-цистеїну на резистентність міокарда до

ішемії-реперфузії. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2014(18,№ 2):372-5.

9. Драчук КО, Коцюрuba АВ, Базілюк ОВ, Степаненко ЛГ, Сагач ВФ. Пропаргілгліцин відновлює ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти у старих щурів. Фізіологічний журнал. 2014(60,№ 4):3-10.
10. Заболотских ИБ, Илюхина ВА. Физиологические основы различий стрессорной устойчивости здорового и больного человека. 1995.
11. Заздравнов АА. Особливості медикаментозної реабілітації уражень стравоходу у хворих на ревматоїдний артрит. Науковий вісник Ужгородського університету. Серія «Медицина». 2011;40:92-95.
12. Зак МЮ, Пасієшвілі ЛМ. Особливості макроскопічного стану слизової оболонки верхнього відділу травного каналу у хворих на хронічний гастрит в поєднанні з остеоартрозом. Український терапевтичний журнал. 2016(3):27-33.
13. Зак МЮ. Нові підходи до класифікації та оптимізація лікування синдрому диспепсії. Сучасна гастроентерологія. 2016(3):73-80.
14. Зак МЮ. Стан слизової оболонки шлунка у хворих на хронічний гастрит в поєднанні з остеоартрозом в умовах терапії нестероїдними протизапальними препаратами. ScienceRise. Medical Science. 2016 Oct 31;10(6):9-12.
15. Заячківська О, Була Н, Павловський Я, Пшик-Тітко І, Гаврилюк О. Цитопротекторні ефекти гідроген сульфід-спорідненої ацетилсаліцилової кислоти на слизову оболонку стравоходу (доклінічні дослідження). Сучасна Гастроентерологія. 2017;1(93):15-21.
16. Заячківська О, Була Н, Пшик-Тітко І, Дз.Л. Хирівська. Роль ендотеліальної дисфункції в збереженні цілості епітеліального бар'єру проксимального відділу травної системи. Кровообіг та гемостаз. 2015;1(2):87-88.

17. Клітинська ОВ. Тантум Верде®–препарат вибору при комплексній терапії стоматологічних захворювань. Современная стоматология. 2017(1):40-1.
18. Козак НП. Особливості уражень гепатобіліарної системи у хворих на остеоартроз. Український медичний часопис. 2000.
19. Коленко ЮГ, Ткачук НМ, Вороніна ІЄ. Місцеве застосування нестероїдних протизапальних засобів у комплексному лікуванні ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки порожнини рота. Современная стоматология. 2016(1):46-9.
20. Кушкевич ІВ, Антоняк ГЛ, Фафула РВ. Активність і кінетичні властивості супероксиддисмутази сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio Piger Vib-7 Ta Desulfomicrobium Sp.* ROD-9. Мікробіологія і біотехнологія. 2014(4 (28)):26-35.
21. Кушкевич І.В. Сульфатвідновлювальні бактерії кишечника людини їх роль у розвитку захворювань. Біологічні студії. 2017 Jun 14;6(2).
22. Манухина ЕБ, Малышев ІЮ. Стресс-лимитирующая система оксида азота. Рос. физиол. журн. им. ИМ Сеченова. 2000;86(10):1283-92.
23. Нечипорук ВМ, Заїчко НВ, Корда ММ. Вплив тиреоїдних гормонів на процеси реметилювання та транссульфування сірковмісних амінокислот в органах щурів. Медична хімія. 2017(19,№ 1):12-8.
24. Няньковський СЛ, Городиловська МІ, Іванців ВА, Бойко ОІ. Диференціальна діагностика езофагітів у школярів. Здоровье ребенка. 2016(8):56-61.
25. Огородник ОГ, Янченко ВО, Бобкова ЛС, Серединська НМ, Демченко АМ. Синтез та анагетичні властивості похідних 5-метил-3-арил-| 1, 2, 4| триазоло| 4, 3-а| піримидин-7-олу. Фармацевтичний журнал. 2017(2):55-61.
26. Охотнікова ОМ, Поночевна ОВ, Мелліна КВ. Ендотеліальна дисфункція як фактор розвитку, тяжкого перебігу і прогнозу системних васкулітів у дітей. Клінічна імунологія. Алергологія. Інсектологія. 2017; (2):46-52.

27. Похилько ВІ, Артёмова НС, Цвіренко СМ, Ковальова ОМ, Вернигора СІ. Клінічний випадок набутої медикаментозної гострої гемолітичної анемії у дитини, внаслідок прийому ібупрофену («Нурофен»). Вісник проблем біології і медицини. 2017(2):177-180.
28. Сагач ВФ, Шиманська ТВ, Гошовська ЮВ. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендogenous сірководню на функцію серця в умовах ішемії–реперфузії. Фізіологічний журнал. 2013(59,№ 4):8-15.
29. Склярва ЮО, Денисенко НВ, Ільків П, Фоменко ІС. Роль газових медіаторів: нітрогену оксиду та гідрогену сульфїду в тонкій кишці щурів за умов інгібування циклооксигенази і ліпооксигенази. Медична та клінічна хімія. 2016;18(3):54-8.
30. Сулаєва ОМ, Уоллас ДЛ. Ефекти газоподібних медіаторів: перспективи гастроїнтестинальної протекції за умов використання протизапальних препаратів. Сучасна гастроентерологія. 2016(3):114-9.
31. Ткач СМ, Онищук ЛО. Роль ерадикації інфекції *Helicobacter pylori* в профілактиці НПЗП-гастропатій. Сучасна гастроентерологія. 2016(1):129-34.
32. Шиманская ТВ, Гошовская ЮВ, Сагач ВФ. Влияние сероводорода на функциональное состояние и резервные возможности миокарда. Доповіді Національної академії наук України. 2013(1):156-61.
33. Яременко ОБ, Микитенко ГМ. Нові можливості підвищення безпеки лікування нестероїдними протизапальними препаратами: у фокусі захист шлунково-кишкового тракту, нирок та суглобів. Здоров'я України. 2016(2):56-8.
34. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*. 1996 Feb 1;16(3):1066-71.
35. Abid S, Mumtaz K, Jafri W, Hamid S, Abbas Z, Shah HA, Khan AH. Pill-induced esophageal injury: endoscopic features and clinical outcomes. *Endoscopy*. 2005 Aug;37(08):740-4.
36. Abraham SC, Cruz-Correa M, Lee LA, Yardley JH, Wu TT. Alendronate-associated esophageal injury: pathologic and endoscopic features. *Modern*

pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 1999 Dec;12(12):1152-7.

37. Almashat SJ, Duan L, Goldsmith JD. Non-reflux esophagitis: A review of inflammatory diseases of the esophagus exclusive of reflux esophagitis. In *Seminars in diagnostic pathology*. WB Saunders. 2014 Mar 31;31(2):89-99.
38. Altaany Z, Ju Y, Yang G, Wang R. The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci. Signal.*. 2014 Sep 9;7(342):ra87.
39. Amaro R, Poniecka AW, Goldberg RI. Herpes esophagitis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2000 Jan 1;51(1):68.
40. Anderson LA, Johnston BT, Watson RP, Murphy SJ, Ferguson HR, Comber H, McGuigan J, Reynolds JV, Murray LJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence. *Cancer research*. 2006 May 1;66(9):4975-82.
41. Armstrong D. Systematic review: persistence and severity in gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2008 Oct 1;28(7):841-53.
42. Assimakopoulos SF, Thonopoulos KC, Louvros E, Theocharis G. Changes in the prevalence of upper gastrointestinal tract diseasea in patients referred for endoscopy during the last fifteen years. *Gut*. 2007;56(suppl III):202.
43. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Budiman-Mak E, Sontag SJ. Risk factors of oesophagitis in arthritic patients. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2001 Sep 1;13(9):1095-9.
44. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. Acid reflux is a poor predictor for severity of erosive reflux esophagitis. *Digestive diseases and sciences*. 2002 Nov 1;47(11):2565-73.
45. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. Risk factors for erosive reflux esophagitis: a case-control study. *The American journal of gastroenterology*. 2001 Jan 1;96(1):41-6.
46. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a tool

- to target aging. *Cell metabolism*. 2016 Jun 14;23(6):1060-5.
47. Becker V, Bajbouj M, Waller K, Schmid RM, Meining A. Clinical trial: persistent gastro oesophageal reflux symptoms despite standard therapy with proton pump inhibitors—a follow up study of intraluminal impedance guided therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007 Nov 1;26(10):1355-60.
 48. Bhattacharyya S, Saha S, Giri K, Lanza IR, Nair KS, Jennings NB, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Basal E, Weaver AL, Visscher DW. Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *PloS one*. 2013 Nov 13;8(11):e79167.
 49. Bjarnason I, Scarpignato C, Takeuchi K, Rainsford KD. Determinants of the short-term gastric damage caused by NSAIDs in man. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 95-106.
 50. Blackler R, Syer S, Bolla M, Ongini E, Wallace JL. Gastrointestinal-sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence. *PLoS One*. 2012 Apr 9;7(4):e35196.
 51. Blackler RW, De Palma G, Manko A, Da Silva GJ, Flannigan KL, Bercik P, Surette MG, Buret AG, Wallace JL. Deciphering the pathogenesis of NSAID enteropathy using proton pump inhibitors and a hydrogen sulfide-releasing NSAID. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015 Jun 15;308(12):G994-1003.
 52. Blackler RW, Gemici B, Manko A, Wallace JL. NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention. *Current opinion in pharmacology*. 2014 Dec 31;19:11-6.
 53. Bonacini M, Young T, Laine L. Histopathology of human immunodeficiency virus-associated esophageal disease. *American Journal of Gastroenterology*. 1993 Apr 1;88(4):549-51.
 54. Bonacini M, Young T, Laine L. The causes of esophageal symptoms in human immunodeficiency virus infection: a prospective study of 110 patients. *Archives of internal medicine*. 1991 Aug 1;151(8):1567-72.

55. Bondarenko AI, Montecucco F, Panasiuk O, Sagach V, Sidoryak N, Brandt KJ, Mach F. GPR55 agonist lysophosphatidylinositol and lysophosphatidylcholine inhibit endothelial cell hyperpolarization via GPR-independent suppression of Na⁺-Ca²⁺ exchanger and endoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling. *Vascular pharmacology*. 2017 Feb 28;89:39-48.
56. Bordea MA, Pirvan A, Sarban C, Margescu C, Leucuta D, Samasca G, Miu N. Pill-induced erosive esophagitis in children. *Clujul Medical*. 2014;87(1):15-18.
57. Borowitz SM. Diagnosis: herpes simplex esophagitis. *Clinical pediatrics*. 2007 Jul;46(6):557-9.
58. Bradley J, Movsas B. Radiation esophagitis: Predictive factors and preventive strategies. *Semin Radiat Oncol*. Oct 2004;14(4):280-6.
59. Brzozowski T, Magierowska K, Magierowski M, Ptak-Belowska A, Pajdo R, Kwiecien S, Olszanecki R, Korbut R. Recent advances in the gastric mucosal protection against stress-induced gastric lesions. Importance of renin-angiotensin vasoactive metabolites, gaseous mediators and appetite peptides. *Current pharmaceutical design*. 2017 Aug 1;23(27):3910-22.
60. Buckner FS, Pomeroy C. Cytomegalovirus disease of the gastrointestinal tract in patients without AIDS. *Clinical infectious diseases*. 1993 Oct 1;17(4):644-56.
61. Bula N, Gavriluk E, Zayachkivska O. Animal model of non-reflux esophagitis via NSAID induced injury and modification biosynthesis of Hydrogen Sulfide. In *digestive diseases and sciences 2014 Aug 1 (Vol. 59, No. 8, pp. 1651-1651)*. Van Godewijckstraat 30, 3311 Gz Dordrecht, Netherlands: Springer.
62. Bula N, Khyrivska D, Gavrilyuk E, Zayachkivska O. Protective role of H₂S-derivative NSAIDs against stress-related esophageal and gastric mucosal injury. Summer School on Stress. From Hans Selye's original concept to recent advances.- Program & Abstracts. University Hospital Center and Grenoble Institute of Neurosciences, Grenoble, France. 2015 June 29 - July 2.
63. Bula N. Drug-induced esophagitis: new look on old problem. *Proceeding of*

- the Shevchenko Scientific Society. *Medical Sciences*. 2016; 47(2):109-110.
64. Bula N, Pavlovsky Y, Student V, Revenko O, Wallace J.L, Zayachkivska O. Translational aspects of place of hydrogen sulfide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs on the tomorrow's landscape for stress associated disorders. *Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences [Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки]*. 2017; 49(1):21.
65. Bula N. Serum GCP-2 and IL-6 are associated with vascular dysfunction and modification of gaseous mediator H₂S pathway during stress. 2nd Regional Congress of Physiological Societies and 4th Congress of Croatian Physiological Society. 2017 September 21-24:61.
66. Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S -releasing drugs as pharmaceuticals. *Journal of medicinal chemistry*. 2010 May 12;53(17):6275-86.
67. Calore EE, Cavaliere JM, Perez NM, Campos SP, Warnke KO. Esophageal ulcers in AIDS. *Pathologica*. 1997 Apr;89(2):155-8.
68. Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & redox signaling*. 2010 May 15;12(10):1203-17.
69. Chan AS, Lau WW, Szeto AC, Wang J, Wong YH. Differential regulation of CXCL8 production by different G protein subunits with synergistic stimulation by G_i-and G_q-regulated pathways. *Journal of Molecular Biology*. 2016 Sep 25;428(19):3869-84.
70. Chan MV, Wallace JL. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2013 Oct 1;305(7):G467-73.
71. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nature Reviews*

- Endocrinology. 2012 Apr 1;8(4):228-36.
72. Chen LI, Chang JM, Kuo MC, Hwang SJ, Chen HC. Combined herpes viral and candidal esophagitis in a CAPD patient: case report and review of literature. *The American journal of the medical sciences*. 2007 Mar 1;333(3):191-3.
 73. Ci L, Yang X, Gu X, Li Q, Guo Y, Zhou Z, Zhang M, Shi J, Yang H, Wang Z, Fei J. Cystathionine γ -lyase deficiency exacerbates CCl₄-induced acute hepatitis and fibrosis in the mouse liver. *Antioxidants & redox signaling*. 2017 Jul 20;27(3):133-49.
 74. Coates AG, Nostrant TT, Wilson JA, Elta GH, Agha FP. Esophagitis caused by nonsteroidal anti-inflammatory medication: case reports and review of the literature on pill-induced esophageal injury. *Southern medical journal*. 1986 Sep;79(9):1094-7.
 75. Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Jun 5;109(23):9161-6.
 76. Creager M. A., Lüscher T. F., Cosentino F., Beckman, J. A.. Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation*. 2003;108(12):1527-32.
 77. De Cicco P, Panza E, Ercolano G, Armogida C, Sessa G, Pirozzi G, Cirino G, Wallace JL, Ianaro A. ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo. *Pharmacological research*. 2016 Dec 31;114:67-73.
 78. DeGaeta L, Levine MS, Guglielmi GE, Raffensperger EC, Laufer I. Herpes esophagitis in an otherwise healthy patient. *American journal of roentgenology*. 1985 Jun 1;144(6):1205-6.
 79. Dellon ES, Gibbs WB, Fritchie KJ, Rubinas TC, Wilson LA, Woosley JT,

- Shaheen NJ. Clinical, endoscopic, and histologic findings distinguish eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009 Dec 31;7(12):1305-13.
80. Dellon ES, Gonsalves N, Hirano I, Furuta GT, Liacouras CA, Katzka DA. ACG clinical guideline: evidenced based approach to the diagnosis and management of esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis (EoE). *The American journal of gastroenterology*. 2013 May 1;108(5):679-92.
81. DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *The American journal of gastroenterology*. 2005 Jan 1;100(1):190-200.
82. Dickhout JG, Carlisle RE, Jerome DE, Mohammed-Ali Z, Jiang H, Yang G, Mani S, Garg SK, Banerjee R, Kaufman RJ, Maclean KN. Integrated stress response modulates cellular redox state via induction of cystathionine γ -lyase cross-talk between integrated stress response and thiol metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Mar 2;287(10):7603-14.
83. Dickman R, Feroze H, Fass R. Gastroesophageal reflux disease and irritable bowel syndrome: a common overlap syndrome. *Current gastroenterology reports*. 2006 Jul 1;8(4):261-5.
84. Dombkowski RA, Naylor MG, Shoemaker E, Smith M, DeLeon ER, Stoy GF, Gao Y, Olson KR. Hydrogen sulfide (H_2S) and hypoxia inhibit salmonid gastrointestinal motility: evidence for H_2S as an oxygen sensor. *Journal of Experimental Biology*. 2011 Dec 1;214(23):4030-40.
85. Dominy JE, Stipanuk MH. New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H_2S , a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutrition reviews*. 2004 Sep 1;62(9):348-53.
86. Donnellan C, Sharma N, Preston C, Moayyedi P. Medical treatments for the maintenance therapy of reflux oesophagitis and endoscopic negative reflux disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004 Jan 1;4.
87. Drachuk KO, Kotsuruba AV, Bazilyuk OV, Stepanenko LG, Sagach VF. Propargylglycine restores endothelium-dependent relaxation of aortic smooth

- muscle in old rats. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2015;6(3).
88. Drachuk KO, Kotsuruba AV, Sagach VF. Effect of sodium hydrosulfide (NaHS) on oxidative/nitrosative stress and endothelium-dependent relaxation in old rats. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2016;7(4).
 89. Dutta P, Nahrendorf M. Regulation and consequences of monocytoysis. *Immunological reviews*. 2014 Nov 1;262(1):167-78.
 90. Ecker GA, Karsh J. Naproxen induced ulcerative esophagitis. *The Journal of rheumatology*. 1992 Apr;19(4):646-7.
 91. Edebo A, Tam W, Bruno M, Van Berkel AM, Jönson C, Schoeman M, Tytgat G, Dent J, Lundell L. Magnification endoscopy for diagnosis of nonerosive reflux disease: a proposal of diagnostic criteria and critical analysis of observer variability. *Endoscopy*. 2007 Mar;39(03):195-201.
 92. Edebo A, Vieth M, Tam W, Bruno M, Van Berkel AM, Stolte M, Schoeman M, Tytgat G, Dent J, Lundell L. Circumferential and axial distribution of esophageal mucosal damage in reflux disease. *Diseases of the Esophagus*. 2007 Jun 1;20(3):232-8.
 93. Elsheikh W, Flannigan KL, McKnight W, Ferraz JG, Wallace JL. Dextran sulfate sodium induces pan-gastroenteritis in rodents: implications for studies of colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2012 Oct 1;63:463-9.
 94. Elsheikh W, Blackler RW, Flannigan KL, Wallace JL. Enhanced chemopreventive effects of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug (ATB-346) in experimental colorectal cancer. Enhanced chemopreventive effects of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug (ATB-346) in experimental colorectal cancer. *Nitric Oxide* 2014; 41: 131-137.
 95. Farrugia G, Szurszewski JH. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2014; 147: 303-313.

96. Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL. Enhanced activity of a hydrogen sulphide releasing derivative of mesalamine (ATB 429) in a mouse model of colitis. *British journal of pharmacology*. 2007 Apr 1;150(8):996-1002.
97. Flannigan KL, Wallace JL. Hydrogen Sulfide: Its production, release and functions. In *Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications 2013*:109-125.
98. Fomenko I, Sklyarov A, Bondarchuk T, Biletska L, Panasyuk N, Wallace JL. Effects of conventional and hydrogen sulfide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats with stress-induced and epinephrine-induced gastric damage. *Stress* 2014; 17: 528-537.
99. Fomenko I, Sklyarov A, Denysenko N, Hrycevych N, Dranitsyna A, Wallace J. Interactions between nitric oxide and hydrogen sulfide generating systems in gastric mucosa under condition of the combined action of stress and Findaids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 2017 Aug;7(08):013-9.
100. Gao L, Cheng C, Sparatore A, Zhang H, Wang C. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation in vitro in part by interfering gap junction channels: effects of ACS14, a hydrogen sulfide-releasing aspirin. *Heart, Lung and Circulation*. 2015 Jan 31;24(1):77-85.
101. Garcia Rodriguez LA, Martin-Perez M, Hennekens CH, Rothwell PM, Lanas A. Bleeding risk with long-term low-dose aspirin: a systematic review of observational studies. *PLoS One* 2016; 11: e0160046. doi: 10.1371/journal.pone.0160046.
102. Geagea A, Cellier C. Scope of drug-induced, infectious and allergic esophageal injury. *Current opinion in gastroenterology*. 2008 Jul 1;24(4):496-501.
103. Gijsbers K, Van Assche G, Joossens S, Struyf S, Proost P, Rutgeerts P, Geboes K, Van Damme J. CXCR1 binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down regulated IL 8/CXCL8 production by leukocytes in

- Crohn's disease and selective GCP 2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. *European journal of immunology*. 2004 Jul 1;34(7):1992-2000.
104. Gliemann L, Rytter N, Lindskrog M, Slingsby MH, Ekerstrøm T, Sylow L, Richter EA, Hellsten Y. Endothelial mechanotransduction proteins and vascular function are altered by dietary sucrose supplementation in healthy young male subjects. *The Journal of Physiology*. 2017; 595:5557-5571.
 105. Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S, Montgomery C, Zboralske FF. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*. 1969 Feb 1;56(2):223-30.
 106. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009 Sep 1;94(9):3171-82.
 107. Gruhlke MC, Slusarenko AJ. The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012 Oct 31;59:98-107.
 108. Guo W, Cheng ZY, Zhu YZ. Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013 Oct 7;34(10):1284-91.
 109. Guo W, Kan JT, Cheng ZY, Chen JF, Shen YQ, Xu J, Wu D, Zhu YZ. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012 Dec 5;2012.
 110. Howden CW, Hornung CA. A systematic review of the association between Barrett's esophagus and colon neoplasms. *American Journal of Gastroenterology*. 1995 Oct 1;90(10):1814-9.
 111. Hrytsevych NR, Zayachkivska O, Yaschenko A. Effect of L-tryptophan on cytoprotection against long term postprandial hyperglycemia-induced esophageal damage in rats. *The FASEB Journal*. 2013 Apr 1;27(1 Supplement):1169-2.
 112. Huang A, Yang YM, Feher A, Bagi Z, Kaley G, Sun D. Exacerbation of endothelial dysfunction during the progression of diabetes: role of oxidative

- stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2012 Mar 15;302(6):R674-81.
113. Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free radical research*. 2010 Sep 1;44(9):971-82.
114. Huang CW, Moore PK. H₂S synthesizing enzymes: biochemistry and molecular aspects. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 230: 3-25.
115. Hudson N, Hawkey CJ. Non-steroidal anti-inflammatory drug associated upper gastrointestinal ulceration and complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993; 5: 412-419.
116. Hvid Jensen F, Pedersen L, Funch Jensen P, Drewes AM. Proton pump inhibitor use may not prevent high grade dysplasia and oesophageal adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: a nationwide study of 9883 patients. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014 May 1;39(9):984-91.
117. Ilkiv I, Lesyk R, Sklyarov O. Evaluation of novel 4-thiazolidinone-based derivatives as possible cytoprotective agents against stress model in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol.* 2017 Jan;7(01):199-203.
118. Ip S, Bonis P, Tatsioni A, Raman G, Chew P, Kupelnick B, Fu L, DeVine D, Lau J. Comparative effectiveness of management strategies for gastroesophageal reflux disease.
119. Jankowski JA, Anderson MR. The treatment, management and prevention of oesophageal cancer. *Expert opinion on biological therapy*. 2001 Nov 1;1(6):1017-28.
120. Jaspersen D. Drug-induced oesophageal disorders. *Drug safety*. 2000 Mar 1;22(3):237-49.
121. Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2014 Feb 10;20(5):770-82.
122. Kadayifci A, Gulsen MT, Koruk M, Savas MC. Doxycycline induced pill esophagitis. *Diseases of the Esophagus*. 2004 Jun 1;17(2):168-71.
123. Kanagy NL, Szabo C, Papapetropoulos A. Vascular biology of hydrogen

- sulfide. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017 May 1;312(5):C537-49.
124. Kandulski A, Malfertheiner P. Gastroesophageal reflux disease—from reflux episodes to mucosal inflammation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012 Jan 1;9(1):15-22.
125. Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. L-Cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell. *Diabetes*. 2006 May 1;55(5):1391-7.
126. Kashfi K, Olson KR. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochemical pharmacology*. 2013 Mar 1;85(5):689-703.
127. Kauffman G. Aspirin-induced gastric mucosal injury: lessons learned from animal models. *Gastroenterology* 1989; 96: 606-614.
128. Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*. 2007 Nov 30;132(1):74-81.
129. Khalaf N, Nguyen T, Ramsey D, El-Serag HB. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Barrett's esophagus. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014 Nov 30;12(11):1832-9.
130. Khyrivska D, Hrytsevych N, Bula N, Pshyk-Titko I, Savytska M, Zayachkivska O, Havryluk E. Effect of CCl₄ and blocking H₂S biosynthesis on oesophageal mucosa rats: model of nonerosive oesophagitis. *Folia medica Cracoviensia*. 2014;54(4):79-90.
131. Khyrivska D., Hrytsevych N., Bula N., Pshyk-Titko I., Savytska M. Novel approach for animal model of experimental esophagitis similar to human nonerosive oesophagitis according to the Esohisto consensus guidelines. *Przegląd Lekarski*. 2014. Vol. 71, supl. 1: 22.
132. Kikendall JW. Pill-induced esophagitis. *Gastroenterology & hepatology*. 2007 Apr;3(4):275.
133. Kimura H. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants & redox signaling*. 2010 May 1;12(9):1111-23.

134. Kimura Y, Mikami Y, Osumi K, Tsugane M, Oka JI, Kimura H. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *The FASEB Journal*. 2013 Jun 1;27(6):2451-7.
135. King AL, Lefer DJ. Cytoprotective actions of hydrogen sulfide in ischaemia–reperfusion injury. *Experimental physiology*. 2011 Sep 1;96(9):840-6.
136. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, Bradley JM, Islam KN, Calvert JW, Tao YX, Dugas TR. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Feb 25;111(8):3182-7.
137. Kirkwood TB, Kapahi P, Shanley DP. Evolution, stress, and longevity. *Journal of anatomy*. 2000 Nov 1;197(4):587-90.
138. Kliemann DA, Pasqualotto AC, Falavigna M, Giaretta T, Severo LC. *Candida* esophagitis: species distribution and risk factors for infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2008 Oct;50(5):261-3.
139. Kodela R, Chattopadhyay M, Velazquez-Martinez CA, Kashfi K. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide- and hydrogen sulfide-releasing hybrid has enhanced chemo-preventive properties compared to aspirin, is gastrointestinal safe with all the classic therapeutic indications. *Biochem Pharmacol* 2015; 98: 564-572.
140. Kondo K., Bhushan S., King A. L., Prabhu S. D., Hamid T., Koenig S., Lefer D. J. H₂S protects against pressure overload–induced heart failure via upregulation of endothelial Nitric Oxide synthase clinical perspective. *Circulation*. 2013;127(10):1116-1127.
141. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 591-599.

142. Konturek SJ, Zayachkivska O, Havryluk XO, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pawlik M, Konturek PC, Czesnikiewicz-Guzik M, Gzhegotsky MR, Pawlik WW. Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007 Jun 1;58(2):361.
143. Kozar VV, Kudria MY, Ustenko NV, Pavlenko TO, Zhurakovska MV. The state of the humoral component of immunity under conditions of metabolic syndrome with underlying hypoestrogenia and its pharmacological correction. *Buk Med Herald*. 2009;13:141-4.
144. Kroll JL, Werchan CA, Reeves AG, Bruemmer KJ, Lippert AR, Ritz T. Sensitivity of salivary hydrogen sulfide to psychological stress and its association with exhaled nitric oxide and affect. *Physiology & Behavior*. 2017 Oct 1;179:99-104.
145. Kuramoto T, Umegaki E, Nouda S, Narabayashi K, Kojima Y, Yoda Y, Ishida K, Kawakami K, Abe Y, Takeuchi T, Inoue T. Preventive effect of irsogladine or omeprazole on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced esophagitis, peptic ulcers, and small intestinal lesions in humans, a prospective randomized controlled study. *BMC gastroenterology*. 2013 Dec 1;13(1):85.
146. L Flannigan K, L Wallace J. Hydrogen sulfide-based anti-inflammatory and chemopreventive therapies: an experimental approach. *Current pharmaceutical design*. 2015 Jun 1;21(21):3012-22.
147. Lanza FL, Hunt RH, Thomson AB, Provenza JM, Blank MA, Risedronate Endoscopy Study Group. Endoscopic comparison of esophageal and gastroduodenal effects of risedronate and alendronate in postmenopausal women. *Gastroenterology*. 2000 Sep 30;119(3):631-8.
148. Lefer DJ. A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Nov 13;104(46):17907-8.
149. Levine MS, Laufer I, Kressel HY, Friedman HM. Herpes esophagitis.

- American Journal of Roentgenology. 1981 May 1;136(5):863-6.
150. Levine MS, Loercher G, Katzka DA, Herlinger H, Rubesin SE, Laufer I. Giant, human immunodeficiency virus-related ulcers in the esophagus. Radiology. 1991 Aug;180(2):323-6.
 151. Levine MS, Loevner LA, Saul SH, Rubesin SE, Herlinger H, Laufer I. Herpes esophagitis: sensitivity of double-contrast esophagography. American Journal of Roentgenology. 1988 Jul 1;151(1):57-62.
 152. Levine MS, Macones Jr AJ, Laufer I. Candida esophagitis: accuracy of radiographic diagnosis. Radiology. 1985 Mar;154(3):581-7.
 153. Levine MS, Woldenberg R, Herlinger H, Laufer I. Opportunistic esophagitis in AIDS: radiographic diagnosis. Radiology. 1987 Dec;165(3):815-20.
 154. Li Q, Winston JH, Sarna SK. Developmental origins of colon smooth muscle dysfunction in IBS-like rats. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2013 Oct 1;305(7):G503-12.
 155. Liacouras CA, Ruchelli E. Eosinophilic esophagitis. Current opinion in pediatrics. 2004 Oct 1;16(5):560-6.
 156. Lichtenberger LM, Phan T, Fang D, *et al.* Bioavailability of aspirin in rats comparing the drug's uptake into gastrointestinal tissue and vascular and lymphatic systems: implications on aspirin's chemopreventive action. J Physiol Pharmacol 2016; 67: 635-642.
 157. Linden DR. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract. Antioxidants & redox signaling. 2014 Feb 10;20(5):818-30.
 158. Ling Q, Yu X, Wang T, Wang SG, Ye ZQ, Liu JH. Roles of the exogenous H₂S -mediated SR-a signaling pathway in renal ischemia/reperfusion injury in regulating endoplasmic reticulum stress-induced autophagy in a rat model. Cellular Physiology and Biochemistry. 2017;41(6):2461-74.
 159. Long JD, Orlando RC. Nonerosive reflux disease. Minerva gastroenterologica e dietologica. 2007 Jun;53(2):127-41.

160. Lowe RC, Wolfe MM. The pharmacological management of gastroesophageal reflux disease. *Minerva gastroenterologica e dietologica*. 2004 Sep;50(3):227-37.
161. Jowicka E, Beitowski J. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports: PR*. 2007;59(1):4-24.
162. Lucendo AJ, Arias Á, González-Cervera J, Yagüe-Compadre JL, Guagnozzi D, Angueira T, Jiménez-Contreras S, González-Castillo S, Rodríguez-Domínguez B, De Rezende LC, Tenias JM. Empiric 6-food elimination diet induced and maintained prolonged remission in patients with adult eosinophilic esophagitis: a prospective study on the food cause of the disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Mar 31;131(3):797-804.
163. Magierowska K, Magierowski M, Surmiak M, *et al*. The protective role of carbon monoxide (CO) produced by heme oxygenases and derived from the CO-releasing molecule CORM-2 in the pathogenesis of stress-induced gastric lesions: evidence for non-involvement of nitric oxide (NO). *Int J Mol Sci* 2016; 17: E442. doi: 10.3390/ijms17040442.
164. Magierowski M, Jasnos K, Drozdowicz D, Ptak-Belowska A, Flannigan KL, Kwiecien S, Wallace JL, Brzozowski T. Su1945 hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative of naproxen ATB-346 protects the gastric mucosa compromised by stress. A comparative study with naproxen and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor. *Gastroenterology*. 2014 May 1;146(5):S-505.
165. Magierowski M, Magierowska K, Hubalewska-Mazgaj M, *et al*. Interaction between endogenous carbon monoxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastroprotection against acute aspirin-induced gastric damage. *Pharmacol Res* 2016; 114: 235-250.
166. Magierowski M, Magierowska K, Kwiecien S, Brzozowski T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. *Molecules*. 2015 May 19;20(5):9099-123.

167. Majka J, Rembiesz K, Migaczewski M, Budzynski A, Ptak-Belowska A, Pabianczyk R, Urbanczyk K, Zub-Pokrowiecka A, Matlok M, Brzozowski T. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is the key event in pathophysiology of Barrett's esophagus. Lesson from experimental animal model and human subjects. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010 Aug 1;61(4):409.
168. Malfertheiner P, Lind T, Willich S, Vieth M, Jaspersen D, Labenz J, Meyer-Sabellek W, Junghard O, Stolte M. Prognostic influence of Barrett's oesophagus and *Helicobacter pylori* infection on healing of erosive gastro-oesophageal reflux disease (GORD) and symptom resolution in non-erosive GORD: report from the ProGORD study. *Gut*. 2005 Jun 1;54(6):746-51.
169. Mann NS, Leung JW. Pathogenesis of esophageal rings in eosinophilic esophagitis. *Medical hypotheses*. 2005 Dec 31;64(3):520-3.
170. Mastrocola R, Collino M, Rogazzo M, Medana C, Nigro D, Boccuzzi G, Aragno M. Advanced glycation end products promote hepatosteatosis by interfering with SCAP-SREBP pathway in fructose-drinking mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2013 Sep 15;305(6):G398-407.
171. McColl KE. *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal reflux disease— the European perspective. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004 Dec 1;20(s8):36-9.
172. Mimidis K, Papadopoulos V, Margaritis V, Thomopoulos K, Gatopoulou A, Nikolopoulou V, Kartalis G. Predisposing factors and clinical symptoms in HIV-negative patients with *Candida* oesophagitis: are they always present?. *International journal of clinical practice*. 2005 Feb 1;59(2):210-3.
173. Minocha A, Greenbaum DS. Pill-esophagitis caused by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *American Journal of Gastroenterology*. 1991 Aug 1;86(8).
174. Módis K, Bos EM, Calzia E, Goor H, Coletta C, Papapetropoulos A, Hellmich MR, Radermacher P, Bouillaud F, Szabo C. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and

- therapeutic aspects. *British journal of pharmacology*. 2014 Apr 1;171(8):2123-46.
175. Modlin IM, Hunt RH, Malfertheiner P, Moayyedi P, Quigley EM, Tytgat GN, Tack J, Heading RC, Holtman G, Moss SF. Diagnosis and management of non-erosive reflux disease – the Vevey NERD Consensus Group. *Digestion*. 2009;80(2):74-88.
176. Mogylnytska LA, Dorofeyeva NA, Malyna AE, Kornelyuk AI, Sagach VF. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II: properties, functions, and pathogenetic significance. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2016;7(2).
177. Nagy P, Pólinkós Z, Nagy A, Budai B, Tyth I, Vasas A. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014 Feb 28;1840(2):876-91.
178. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Katada K, Yoshikawa T. Multiple targets of carbon monoxide gas in the intestinal inflammation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2016 Apr 1;595:147-52.
179. Namasivayam V, Murray JA. Drug-Induced Esophageal Injury. In *Principles of Deglutition*. Springer New York. 2013:645-656.
180. Noll C, Lacraz G, Ehses J, Coulaud J, Bailbe D, Paul JL, Portha B, Homo-Delarche F, Janel N. Early reduction of circulating homocysteine levels in Goto–Kakizaki rat, a spontaneous nonobese model of type 2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2011 Jun 30;1812(6):699-702.
181. Nonevski IT, Downs-Kelly E, Falk GW. Eosinophilic esophagitis: an increasingly recognized cause of dysphagia, food impaction, and refractory heartburn. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2008 Sep;75(9):623-6, 629-33.
182. Novosad VL, Richards JL, Phillips NA, King MA, Clanton TL. Regional susceptibility to stress-induced intestinal injury in the mouse. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2013 Sep 15;305(6):G418-26.

183. Nurko S, Rosen R, Furuta GT. Esophageal dysmotility in children with eosinophilic esophagitis: a study using prolonged esophageal manometry. *The American journal of gastroenterology*. 2009 Dec 1;104(12):3050-7.
184. Olson KR, Donald JA. Nervous control of circulation—the role of gasotransmitters, NO, CO, and H₂S. *Acta histochemica*. 2009 May 31;111(3):244-56.
185. Olson KR. A practical look at the chemistry and biology of hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling*. 2012 Jul 1;17(1):32-44.
186. Panarelli NC. Drug-induced injury in the gastrointestinal tract. In *Seminars in diagnostic pathol*. 2014;31(2):165-175.
187. Paul BD, Sbodio JI, Xu R, Vandiver MS, Cha JY, Snowman AM, Snyder SH. Cystathionine γ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature*. 2014 May;509(7498):96.
188. Paul BD, Snyder SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012 Aug 1;13(8):499-507.
189. Pawlik M, Pajdo R, Kwiecien S, Ptak-Belowska A, Sliwowski Z, Mazurkiewicz-Janik M, Konturek SJ, Pawlik WW, Brzozowski T. Nitric oxide (NO)-releasing aspirin exhibits a potent esophagoprotection in experimental model of acute reflux esophagitis. Role of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011 Feb 1;62(1):75.
190. Pshyk-Titko I, Bula N, Khyrivska D, Bisyarin Y, Havryluk E, Zayachkivska O. Cyclooxygenase-dependent modulation of gastro-esophageal mucosal integrity by hydrogen sulfide against stress-induced injury. 15th International Conference of Ulcer Research, at Ottawa, Canada. *Digestive Diseases And Sciences* 2015 Sep 1;60(9): 2551-2552.
191. Pshyk-Titko I, Bula N, Pavlovsky Y, Zayachkivska O. The comparison of hydrogen sulfide NSAID derivates in the modulation of gastro-esophageal integrity. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016;88. RECOOP HST Association. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference

- Prague, Czech Republic. 2016 April 7 – 10:55.
192. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the tumor microenvironment. *Trends in immunology*. 2016 Jan 31;37(1):41-52.
 193. Powell D, Tauzin S, Hind LE, Deng Q, Beebe DJ, Huttenlocher A. Chemokine signaling and the regulation of bidirectional leukocyte migration in interstitial tissues. *Cell reports*. 2017 May 23;19(8):1572-85.
 194. Prasad GA, Alexander JA, Schleck CD, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Elias RM, Locke GR, Talley NJ. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009 Oct 31;7(10):1055-61.
 195. Predmore BL, Kondo K, Bhushan S, Zlatopolsky MA, King AL, Aragon JP, Grinsfelder DB, Condit ME, Lefer DJ. The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012 Mar 30;302(11):H2410-8.
 196. Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants & redox signaling*. 2012 Jul 1;17(1):119-40.
 197. Quarto G, Sivero L, Somma P, De Rosa G, Mosella F, Nunziata G, Solimeno G, Benassai G. A case of infectious esophagitis caused by human papilloma virus. *Minerva gastroenterologica e dietologica*. 2008 Sep;54(3):317-21.
 198. Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):316-25.
 199. Rafii S, Ginsberg M, Scandura J, Butler JM, Ding BS. Transplantation of endothelial cells to mitigate acute and chronic radiation injury to vital organs. *Radiation research*. 2016 Jul 26;186(2):196-202.
 200. Rieder F, Biancani P, Harnett K, Yerian L, Falk GW. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility,

- fibrosis, and carcinogenesis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010 May 1;298(5):G571-81.
201. Rothenberg ME. Biology and treatment of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*. 2009 Oct 31;137(4):1238-49.
202. Ruigomez A, Garcia Rodriguez LA, Wallander MA, Johansson S, Graffner H, Dent J. Natural history of gastro-oesophageal reflux disease diagnosed in general practice. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2004 Oct 1;20(7):751-60.
203. Sadeghi S, Bain CJ, Pandeya N, Webb PM, Green AC, Whiteman DC. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and the risks of cancers of the esophagus. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2008 May 1;17(5):1169-78.
204. Sagach VF, Dorofeyeva NA, Drachuk KO. Hydrogen sulfide donor inhibits oxidative and nitrosative stress, cardiohemodynamics disturbances and restores cNOS coupling in old rats. In *Cardiovascular Research*. Great Clarendon St, Oxford Ox2 6dp, England: Oxford Univ Press. 2016 Jul 1;111:S22-S23.
205. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshovska YV, Dobrovolska RA. Effects of stimulation and blockade of endogenous hydrogen sulfide synthesis in myocardial ischemia-reperfusion. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2014;5(3).
206. Sam JW, Levine MS, Rubesin SE, Laufer I. The “foamy” esophagus: a radiographic sign of *Candida* esophagitis. *American Journal of Roentgenology*. 2000 Apr;174(4):999-1002.
207. Satoh H, Sato F, Takami K, Szabo S. New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1997;73(4):299-309.
208. Schicho R, Krueger D, Zeller F, Von Weyhern CW, Frieling T, Kimura H, Ishii I, De Giorgio R, Campi B, Schemann M. Hydrogen sulfide is a novel

- prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology*. 2006 Nov 30;131(5):1542-52.
209. Schneider JL, Zhao WK, Corley DA. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Barrett's esophagus. *Digestive diseases and sciences*. 2015 Feb 1;60(2):436-43.
210. Schneider NI, Plieschnegger W, Geppert M, Wigglinghaus B, Hoess GM, Eherer A, Wolf EM, Rehak P, Vieth M, Langner C. Validation study of the Esohisto consensus guidelines for the recognition of microscopic esophagitis (histoGERD Trial). *Human pathology*. 2014 May 31;45(5):994-1002.
211. Schneider, J. L., Zhao, W. K., & Corley, D. A. (2014). Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Barrett's oesophagus. *Digestive diseases and sciences*:1-8.
212. Schror K. Aspirin modes of action and clinical benefits: what we know today CME. 2015.
213. Seifert WF, Bosma A, Brouwer A, Hendriks HF, Roholl PJ, van Leeuwen RE, van Thiel De Ruitter GC, Seifert Bock I, Knook DL. Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats. *Hepatology*. 1994 Jan 1;19(1):193-201.
214. Selye H, Szabo S. Experimental model for production of perforating duodenal ulcers by cysteamine in the rat. *Nature*. 1973 Aug;244:458-9.
215. Selye H. Confusion and controversy in the stress field. *J Human Stress* 1975; 1: 37-44
216. Sen U, Givvimani S, Abe OA, Lederer ED, Tyagi SC. Cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase double gene transfer ameliorate homocysteine-mediated mesangial inflammation through hydrogen sulfide generation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011 Jan 1;300(1):C155-63.
217. Sestito S, Nesi G, Pi R, Macchia M, Rapposelli S. Hydrogen sulfide: a worthwhile tool in the design of new multitarget drugs. *Front Chem* 2017; 5: 72. doi: 10.3389/fchem.2017.00072.

218. Singh UP, Singh NP, Murphy EA, Price RL, Fayad R, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*. 2016 Jan 31;77:44-9.
219. Singh UP, Singh S, Taub DD, Lillard JW. Inhibition of IFN- γ -inducible protein-10 abrogates colitis in IL-10 $^{-/-}$ mice. *The Journal of Immunology*. 2003 Aug 1;171(3):1401-6.
220. Söderholm JD. Stress-related changes in oesophageal permeability: filling the gaps of GORD? *Gut*. 2007 Sep 1;56(9):1177-80.
221. Söderholm JD. Mast cells and mastocytosis. *Digestive Diseases*. 2009;27(Suppl. 1):129-36.
222. Sostres C, Lanas A. Gastrointestinal effects of aspirin. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 385-394.
223. Souza RF. Molecular mechanisms of acid exposure in Barrett's esophagus. *Inflammopharmacology*. 2007 Jun 28;15(3):95-100.
224. Souza RF, Morales CP, Spechler SJ. A conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2001 Aug 22;15(8):1087-100.
225. Straumann A, Conus S, Degen L, Felder S, Kummer M, Engel H, Bussmann C, Beglinger C, Schoepfer A, Simon HU. Budesonide is effective in adolescent and adult patients with active eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*. 2010 Nov 30;139(5):1526-37.
226. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical science*. 2014 May 1;126(9):593-612.
227. Sulaieva O, Wallace JL. Gaseous mediator-based anti-inflammatory drugs. *Current opinion in pharmacology*. 2015 Dec 31;25:1-6.
228. Szabo C, Ransy C, Mydis K, Andriamihaja M, Murches B, Coletta C, Olah G, Yanagi K, Bouillaud F. Regulation of mitochondrial bioenergetic function

- by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British journal of pharmacology*. 2014 Apr 1;171(8):2099-122.
229. Szabo C, Ransy C, Mydis K, Andriamihaja M, Murches B, Coletta C, Olah G, Yanagi K, Bouillaud F. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British journal of pharmacology*. 2014 Apr 1;171(8):2099-122.
230. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery*. 2007 Nov 1;6(11):917-35.
231. Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *British journal of pharmacology*. 2009 Mar 1;156(5):713-27.
232. Szabo S, Haith LR, Reynolds ES. Pathogenesis of duodenal ulceration produced by cysteamine or propionitrile. *Digestive diseases and sciences*. 1979 Jun 30;24(6):471-7.
233. Szabo S. Duodenal ulcer disease. Animal model: cysteamine-induced acute and chronic duodenal ulcer in the rat. *The American journal of pathology*. 1978 Oct;93(1):273.
234. Taddei A, Fabbroni V, Pini A, Lucarini L, Ringressi MN, Fantappiè O, Bani D, Messerini L, Masini E, Bechi P. Cyclooxygenase-2 and inflammation mediators have a crucial role in reflux-related esophageal histological changes and Barrett's esophagus. *Digestive diseases and sciences*. 2014 May 1;59(5):949-57.
235. Taggart H, Bolognese MA, Lindsay R, Ettinger MP, Mulder H, Josse RG, Roberts A, Zippel H, Adami S, Ernst TF, Stevens KP. Upper gastrointestinal tract safety of risedronate: a pooled analysis of 9 clinical trials. *In Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier. 2002 Mar 31;77(3):262-270.
236. Takagi K, Kasuya Y, Watanabe K. Studies on the drugs for peptic ulcer. a reliable method for producing stress ulcer in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1964 Apr 25;12(4):465-72.
237. Takagi K, Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. *Jpn J Pharmacol* 1968; 19: 9-19.

238. Takeuchi K, Aihara E, Kimura M, Dogishi K, Hara T, Hayashi S. Gas mediators involved in modulating duodenal HCO_3^- secretion. *Current medicinal chemistry*. 2012 Jan 1;19(1):43-54.
239. Takeuchi K, Ise F, Takahashi K, Aihara E, Hayashi S. H_2S -induced HCO_3^- secretion in the rat stomach: Involvement of nitric oxide, prostaglandins, and capsaicin-sensitive sensory neurons. *Nitric Oxide*. 2015 Apr 30;46:157-64.
240. Triantos C, Koukias N, Karamanolis G, Thomopoulos K. Changes in the esophageal mucosa of patients with non erosive reflux disease: How far have we gone? *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2015 May 21;21(19):5762-7.
241. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014 Nov 30;1843(11):2563-82.
242. Van Staa T, Abenhaim L, Cooper C. Upper gastrointestinal adverse events and cyclical etidronate. *The American journal of medicine*. 1997 Dec 1;103(6):462-7.
243. Vas PR, Alberti KG, Edmonds ME. Prediabetes: moving away from a glucocentric definition. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2017 Nov 1;5(11):848-9.
244. Vas PR, Edmonds ME. Early recognition of diabetic peripheral neuropathy and the need for one-stop microvascular assessment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2016 Sep 1;4(9):723-5.
245. Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 1997 Mar;112(3):1000-16.
246. Wallace J, Pshyk-titko I, Muscara MN, Bula N, Pavlovsky Y, Gavruluk E, Zayachkivska O. Influence of Hydrogen Sulfide-releasing aspirin on mucosal integrity of esophageal and gastric mucosa. *Proceedings of the scientific society of them. Shevchenko Medical sciences. Medical collection.*. 2015;43(27):63-74.
247. Wallace JL, Blackler RW, Chan MV, Da Silva GJ, Elsheikh W, Flannigan KL, Gamaniek I, Manko A, Wang L, Motta JP, Buret AG. Anti-inflammatory

- and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. *Antioxidants & redox signaling*. 2015 Feb 10;22(5):398-410.
248. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology*. 2007 Jan 31;132(1):261-71.
249. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide releasing derivative of naproxen (ATB-346). *British journal of pharmacology*. 2010 Mar 1;159(6):1236-46.
250. Wallace JL, Dicay M, McKnight W, Martin GR. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *The FASEB Journal*. 2007 Dec 1;21(14):4070-6.
251. Wallace JL, Ferraz JG, Muscara MN. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. *Antioxidants & redox signaling*. 2012 Jul 1;17(1):58-67.
252. Wallace JL, Ianaro A, de Nucci G. Gaseous mediators in gastrointestinal mucosal defense and injury. *Digestive Diseases and Sciences*. 2017 Sep 1;62(9):2223-30.
253. Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1990 Sep 1;259(3):G462-7.
254. Wallace JL, Syer S, Denou E, de Palma G, Vong L, McKnight W, Jury J, Bolla M, Bercik P, Collins SM, Verdu E. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology*. 2011 Oct 31;141(4):1314-22.
255. Wallace JL, Vaughan D, Dicay M, MacNaughton WK, de Nucci G. Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the Clinic. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017 May 15.
256. Wallace JL, Vong L, Dharmani P, Srivastava V, Chadee K. Muc-2-deficient mice display a sex-specific, COX-2-related impairment of

- gastric mucosal repair. *The American journal of pathology*. 2011 Mar 31;178(3):1126-33.
257. Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology*. 2009 Aug 31;137(2):569-78.
258. Wallace JL, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015 May 1;14(5):329-45.
259. Wallace JL. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007 Oct 31;28(10):501-5.
260. Wallace JL. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2013 Mar 28;19(12):1861.
261. Wallace, J. L. Hydrogen sulfide: a rescue molecule for mucosal defence and repair. *Digestive diseases and sciences*. 2012;57(6):1432-4.
262. Walsh TJ, Hamilton SR, Belitsos N. Esophageal candidiasis: managing an increasingly prevalent infection. *Postgraduate medicine*. 1988 Aug 1;84(2):193-205.
263. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological reviews*. 2012 Apr 1;92(2):791-896.
264. Wang RU. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB journal*. 2002 Nov 1;16(13):1792-8.
265. Wilhelm AB, Miranda-Filho DD, Nogueira RA, Rêgo RS, Lima KD, Pereira LM. The resistance to fluconazole in patients with esophageal candidiasis. *Arquivos de gastroenterologia*. 2009 Mar;46(1):32-7.
266. Winstead NS, Bulat R. Pill esophagitis. Current treatment options in gastroenterology. 2004 Feb 1;7(1):71-6.
267. Wolin MS. Reactive oxygen species and the control of vascular function.

- American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2009 Mar 1;296(3):H539-49.
268. Woodland P, Lee C, Duraysami Y, Farré R, Dettmar P, Sifrim D. Assessment and protection of esophageal mucosal integrity in patients with heartburn without esophagitis. *The American journal of gastroenterology*. 2013 Apr 1;108(4):535-43.
269. Wu D, Hu Q, Zhu Y. Therapeutic application of hydrogen sulfide donors: the potential and challenges. *Frontiers of medicine*. 2016 Mar 1;10(1):18-27.
270. Wu YC, Wang XJ, Yu L, Chan FK, Cheng AS, Yu J, Sung JJ, Wu WK, Cho CH. Hydrogen sulfide lowers proliferation and induces protective autophagy in colon epithelial cells. *PLoS One*. 2012 May 29;7(5):e37572.
271. Wuyts A, Struyf S, Gijssbers K, Schutyser E, Put W, Conings R, Lenaerts JP, Geboes K, Opdenakker G, Menten P, Proost P. The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1 β and is down-regulated by interferon- γ : comparison with interleukin-8/CXCL8. *Laboratory investigation*. 2003 Jan 1;83(1):23-34.
272. Yang CT, Lai ZZ, Zheng ZH, Kang JM, Xian M, Wang RY, Shi K, Meng FH, Li X, Chen L, Zhang H. A novel pH controlled hydrogen sulfide donor protects gastric mucosa from aspirin induced injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017 Apr 7.
273. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science*. 2008 Oct 24;322(5901):587-90.
274. Yang G, Wu L. Trend in H₂S Biology and Medicine Research—A Bibliometric Analysis. *Molecules*. 2017 Nov 29;22(12):2087.
275. Yerian L, Fiocca R, Mastracci L, Riddell R, Vieth M, Sharma P, Franzen S, Fernstrom P, Ruth M. Refinement and reproducibility of histologic criteria for the assessment of microscopic lesions in patients with gastroesophageal reflux disease: the Esohisto Project. *Digestive diseases and sciences*. 2011 Sep 1;56(9):2656-65.

276. Young CN. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of hypertension. *Experimental Physiology*. 2017 Jun 12;102:869-884.
277. Zagari RM, Fuccio L, Wallander MA, Johansson S, Fiocca R, Casanova S, Farahmand BY, Winchester CC, Roda E, Bazzoli F. Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and Barrett's oesophagus in the general population: the Loiano–Monghidoro study. *Gut*. 2008 Oct 1;57(10):1354-9.
278. Zaichko NV, Melnik AV, Yoltukhivskyy MM, Olhovskiy AS, Palamarchuk IV. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role. *The Ukrainian biochemical journal*. 2014(86,№ 5):5-25.
279. Zaichko NV, Mel'nyk AV, Iurchenko PO, Hryhor HS, Konakhovych NF. Influence of polymicroelement preparation esmin on hydrogen sulfide levels and indices of pro-and antioxidant system in the rat myocardium of different age. *Ukrainian biochemical journal*. 2014;86(3):69-76.
280. Zaichko NV, Pentiuk OO. Influence of hydrogen sulfide, dithionite, sulfite, thiosulfate and sulfate anions on human platelet aggregation. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal (1999)*. 2009;81(1):105-13.
281. Zaichko NV, Yurchenko P. A., Filchukov D. A. State of hydrogen sulfide system in the rats brain under combined hyperhomocysteinemia and its correction. *Journal of Education, Health and Sport*. 2015;5(3):183-188. ISSN 2391-8306.
282. Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB journal*. 2006 Oct 1;20(12):2118-20.
283. Zayachkivska O, Bula N, Khyrivska D, Gavrilyuk E, Wallace JL. 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. *Inflammopharmacology*. 2015 Jun 1;23(2-3):91-9.
284. Zayachkivska O, Bula N, Pavlovsky Y, Gavrilyuk E, Wallace J. H₂S - releasing aspirin exerts protective effect in esophageal and gastric mucosal

- stress-associated injury. The FASEB Journal. 2016 Apr 1;30 (1 Supplement):1271.1.
285. Zayachkivska O, Bula N, Pavlovsky Y, Gavriluk E, Wallace J. Physiological aspects of H₂S-aspirin influence on esophageal and mucosa integrity. RECOOP 2015 Annual Project Review 6th TriNet Meeting, Prague. RECOOP HST Association. 2015 October 15-18: 37.
286. Zayachkivska O, Bula N, Pshyk-Titko I, Hrytsevych N, Khyrivska D. Translational Study of Esophageal Damage: Dreams and Barriers. 15th International Conference of Ulcer Research, at Ottawa, Canada. Digestive Diseases and Sciences. 2015 Sep 1;60(9): 2558-2558.
287. Zayachkivska O, Gzregotsky M, Ferenc M, Yaschenko A, Urbanovych A. Effects of nitrosative stress and reactive oxygen, scavenging systems in esophageal physiopathy under streptozotocin-induced experimental hyperglycemia Journal of physiology and pharmacology. 2008;59(2):77-87.
288. Zayachkivska O, Havryluk O, Hrycevych N, Bula N, Grushka O, Wallace JL. Cytoprotective effects of hydrogen sulfide in novel rat models of non-erosive esophagitis. PloS one. 2014 Oct 21;9(10):e110688.
289. Zayachkivska O, Pavlovsky Y, Student V, Revenko O, Bula N. The Role of H₂S in stress: new insight on animal models and translational aspects. 8th RECOOP Annual Project Review Meeting, Croatia. RECOOP HST Association. 2017 October 19-21:81.
290. Zayachkivska O, Pshyk-Titko I, Hrytsevych N, Bula N, Khyrivska D, Savytska M, Gavriluk H. Experimental esophagitis research: new insight on animal models and translational aspects. Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific conferences Split, Croatia. RECOOP HST Association. 2014 May 27-June 1 : 90.
291. Zayachkivska O, Savytska M, Pinyajko R, Gzhegotsky M. Esophageal structural and functional reorganisation: role of endogenous defence mediators. In Journal of Physiological Sciences. 2009 Jan 1;59:389
292. Zayachkivska O. Physiopathology of esophageal inflammation,

- ulcerogenesis and repair by studying the profile of glycoconjugate. In *Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection in the Gastrointestinal Tract* 2012;30:148-160.
293. Zayachkivska RO, Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pawlik M, Drozdowicz D, Gzhegotsky M, Konturek SJ, Pawlik WW. Melatonin (Mt) attenuates the experimentally-induced esophagitis through increased generation of mucosal prostaglandins and nitric oxide, enhanced activation of sensory nerves and elevation of esophageal blood flow. In *Gastroenterology*. 2007 Apr 1;132(4):A274-A274.
294. Zayachkivska OS, Bula NS, Pavlovskiy YaI, Pshyk-Titko I.O., Gavriluk O.M., Grushka O.I., Wallace J.L. Effect of hydrogen sulfide-releasing aspirin on esophageal and gastric mucosa compromised by stress injury. *Ukr.Biochem.J.* 2017;89(Special Issue):93-101.
295. Zhang Q, Horowitz M, Rigda R, Rayner C, Worynski A, Holloway RH. Effect of hyperglycemia on triggering of transient lower esophageal sphincter relaxations. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004 May 1;286(5):G797-803.
296. Zhang S, Grabauskas G, Wu X, Joo MK, Heldsinger A, Song I, Owyang C, Yu S. Role of prostaglandin D₂ in mast cell activation-induced sensitization of esophageal vagal afferents. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2013 May 15;304(10):G908-16.

ДОДАТКИ

Додаток А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Cytoprotective effects of hydrogen sulfide in novel rat models of non-erosive esophagitis / O.S. Zayachkivska, O.M. Havryluk, N.R. Hrycevych, N.S. Bula, O.I. Grushka, J.L. Wallace // *PloS one*. – 2014. – №9 (10). – P. 1-8.
2. Effect of CCl₄ and blocking H₂S 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 Cracoviensia*. – 2014. – №54(4). – P. 79-90.
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.
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.
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.
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.

7. H₂S-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.

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.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Була Н, Хирівська Д, Гаврилюк О, Заячківська О. Цитопротекторні впливи сірководню в умовах хронічного ураження проксимального відділу травної системи нестероїдними протизапальними препаратами (експериментальні дослідження). XIV З'їзд Всеукраїнського Лікарського Товариства. VI Конгрес Південно-Східно Європейського Медичного Форуму. Одеса 2015 вересень 9-12:403.

2. Заячківська О, Була Н, Пшик-Тітко І, Хирівська Д. Роль ендотеліальної дисфункції в збереженні цілості епітеліального бар'єру проксимального відділу травної системи. Кровообіг та гемостаз. 2015;1(2):87-88.

3. Zayachkivska O, Pshyk-Titko I, Hrytsevych N, Bula N, Khyrivska D, Savytska M, Gavrilyuk H. Experimental esophagitis research: new insight on animal models and translational aspects. Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific conferences Split, Croatia. RECOOP HST Association. 2014 May 27-June 1:90.

4. Bula N, Khyrivska D, Gavrilyuk E, Zayachkivska O. Protective role of H₂S-derivative NSAIDs against stress-related esophageal and gastric mucosal injury. Summer School on Stress. From Hans Selye's original concept to recent advances. Program & Abstracts. University Hospital Center and Grenoble Institute of Neurosciences, Grenoble, France. 2015 June 29-July 2: 27.

5. Pshyk-Titko I, Bula N, Khyrivska D, Bisyarin Y, Havryluk E, Zayachkivska O. Cyclooxygenase-dependent modulation of gastro-esophageal mucosal integrity by hydrogen sulfide against stress-induced injury. 15th International Conference of Ulcer Research, at Ottawa, Canada. Digestive Diseases And Sciences 2015 Sep 1;60(9):2551-2552.

6. Zayachkivska O, Bula N, Pshyk-Titko I, Hrytsevych N, Khyrivska D. Translational study of esophageal damage: dreams and barriers. 15th International Conference of Ulcer Research, at Ottawa, Canada. Digestive Diseases and Sciences. 2015 Sep 1;60(9):2558-2558.

7. Zayachkivska O, Bula N, Pavlovsky Y, Gavriluk E, Wallace J. Physiological aspects of H₂S-aspirin influence on esophageal and mucosa integrity. RECOOP 2015 Annual Project Review 6th TriNet Meeting, Prague. RECOOP HST Association. 2015 October 15-18:37.

8. Zayachkivska O, Bula N, Pavlovsky Y, Gavriluk E, Wallace J. H₂S-releasing aspirin exerts protective effect in esophageal and gastric mucosal stress-associated injury. The FASEB Journal. 2016 Apr 1;30 (1 Supplement):1271.1.

9. Pshyk-Titko I, Bula N, Pavlovsky Y, Zayachkivska O. The comparison of hydrogen sulfide NSAID derivatives in the modulation of gastro-esophageal integrity. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016;88. RECOOP HST Association. Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference Prague, Czech Republic. 2016 April 7-10:55.

10. Bula N. Drug-induced esophagitis: new look on old problem. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2016;47(2):109-110.

11. Bula N, Pavlovsky Y, Student V, Revenko O, Wallace1 JL, Zayachkivska O. Translational aspects of place of hydrogen sulfide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs on the tomorrow's landscape for stress associated disorders. Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences. 2017;49(1):21.

12. Bula N. Serum GCP-2 and IL-6 are associated with vascular dysfunction and modification of gaseous mediator H₂S pathway during stress. 2nd Regional Congress of Physiological Societies and 4th Congress of Croatian Physiological Society. 2017 September 21-24:61.

13. Zayachkivska O, Pavlovsky Y, Student V, Revenko O, Bula N. The role of H₂S in stress: new insight on animal models and translational aspects. 8th RECOOP Annual Project Review Meeting, Croatia. RECOOP HST Association. 2017 October 19-21:81.

Апробація результатів дисертації:

- Міжнародна медична конференція молодих вчених. Єгелонський медичний університет, Краків 10-12 квітня 2014 р. *Стендова доповідь.*
- IX щорічна наукова медична конференція, Спліт, Хорватія. Асоціація «RECOOP» . 27 травня -1 червня 2014р. *Стендова доповідь*
- XVIII Міжнародний симпозіум з цитопротекції та органопротекції Будапешт, Угорщина. 24-26 вересня 2014 р. *Стендова доповідь, публікація тез.*
- Літня школа Стресу. Ханса Сельє оригінальна концепція та останні досягнення. Університетський медичний центр. Гренобль, Франція. 29липня - 2 серпня 2015 р. *Курс лекцій та участь в семінарах.*
- XIV З'їзд Всеукраїнського Лікарського Товариства. VI Конгрес Південно-Східно Європейського Медичного Форуму. Одеса 2015 вереснь 9-13. *Підготовка матеріалів до друку.*
- XV Міжнародна конференція з вивчення виразки. Отава, Канада. 22-25 вересня 2015 р. *Підготовка матеріалів до друку.*

- Річний підсумковий з'їзд організації «RECOOP» Прага, Чехія. 15-18 вересня 2015 р. *Стенова доповідь, публікація тез.*
- Науково-практична конференція з міжнародною участю “Ендотеліальна дисфункція при вік-залежній патології – діагностика, профілактика, лікування”. Київ. 12-13 листопада 2015. *Стенова доповідь, публікація тез.*
- Організація «RECOOP» XI Щорічна конференція «Мости в життя» Прага, Чехія. 7-10 квітня 2016 р. *Стенова доповідь, публікація тез*
- Цедар-Сінай медичний центр та організація «RECOOP» Щорічна конференція «Мости в життя». Будапешт, Угорщина 6-7 квітня 2017 р. *Стенова доповідь, публікація тез.*
- II Регіональний конгрес фізіології, IV Конгрес фізіологів Хорватії. Дубровнік, Хорватія. 21-24 серпня 2017 р. *Стенова доповідь, публікація тез.*
- VIII З'їзд організації «RECOOP», Хорватія. 19-21 жовтня 2017р. *Публікація тез.*

Додаток Б 1

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
 Державного закладу «Дніпропетровська
 медична академія Міністерства охорони
 здоров'я України» д.мед.н., професор
 В.Й. МАМЧУР
 2017 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи здобувача Була Назара Степановича

1. **Найменування пропозиції до впровадження:** Вплив сірководню на регенераторні властивості слизової оболонки верхніх відділів шлунково-кишкового тракту.
2. **Установа:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, кафедра нормальної фізіології.
3. **Джерела інформації:**
 - Була Н. С. Цитопротекторні впливи сірководню в умовах хронічного ураження проксимального відділу травної системи нестероїдними протизапальними препаратами (експериментальні дослідження). /Заячківська О. С., Була Н.С., Хирівська Дз., Гаврилюк О. // Матеріали XIV з'їзду Всеукраїнського Лікарського товариства, VI Конгресу Південно - Східного Європейського медичного форуму. - Одеса, 9-12 вересня 2015 р. -С.403.
 - Bula N. The comparison of Hydrogen Sulfide NSAID derivated in the modulation of gastro-esophageal integrity. / Bula N., Pavlovsky J, Zayachkivska O // Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference Prague, Czech Republic, April 7 – 10, 2016. -P.55.
4. **Де та коли впроваджено:** кафедра фізіології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», в лекційному курсі та при проведенні практичних занять з розділу «Фізіологія травлення».
5. **Результати впровадження:** Використання результатів дослідження у навчальному процесі доповнює знання про механізми цитопротекції слизової оболонки верхніх відділів шлунково-кишкового тракту.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:

д. мед. н., професор

М. О.С.

2017р.

Родинський О.Г.

Додаток Б 2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

доктор біологічних наук,
проф. Ерстенюк Г.М.
2016р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів дисертаційної роботи здобувача Були Н.С.

1. **Найменування пропозиції до впровадження:** Роль гідрогенсульфіду (H₂S) у механізмах цитопротекції слизової стравоходу.
2. **Установа:** ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», кафедра фізіології, вул. Галицька 2, м. Івано-Франківськ.
3. **Джерела інформації:**

Influence of hydrogen sulfide-releasing aspirin on mucosal integrity of esophageal and gastric mucosa / Джон Воллас, Ірена Пшик-Тітко, Марчело Мускара, Назар Була, Ярослав Павловський, Олена Гаврилюк, Оксана Заячківська // Proc. Shevchenko Sci. Soc. Medicine, 2015.- Vol. XLIII.- P. 63-74.

Була Н. H₂S-похідні нестероїдних протизапальних препаратів як нові модулятори цілісності слизової оболонки стравоходу та шлунка / Н. Була, Д. Хирівська, О. Гаврилюк, О. Заячківська // Proc. Shevchenko Sci. Soc. Medicine, 2015.- Vol. XLIII.- P. 53-63.

4. **Де та коли впроваджено:** На кафедрі фізіології ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» в лекційному курсі та при проведенні практичних занять з розділу «Фізіологія травлення».
5. **Результати впровадження:** Використання результатів дослідження у навчальному процесі дозволяє поглибити знання про роль гідрогенсульфіду (H₂S) у механізмах цитопротекції слизової стравоходу.
6. **Термін впровадження:** 2015-2016 рр.
7. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра фізіології ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фізіології
ДВНЗ «Івано-Франківський
національний медичний університет»
д. мед. н., професор


Н.М. Воронич-Семченко

Додаток Б 3

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

матеріалів дисертаційної роботи
 здобувача Була Назара Степановича

- Найменування пропозиції до впровадження:** Роль гідроген сульфід у механізмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу
- Установа:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, кафедра нормальної фізіології.
- Джерела інформації:**
 Заячківська О, Була Н, Павловський Я, Пшик-Тітко І, Гаврилук О. Цитопротекторні ефекти гідроген сульфід-спорідненої ацетилсалцилової кислоти на слизову оболонку стравоходу (доклінічні дослідження). Сучасна Гастроентерологія. 2017;1(93):15-21.
 Zayachkivska O, Bula N, Pavlovsky Y, Gavriluk E, Wallace J. Physiological aspects of H2S-aspirin influence on esophageal and mucosa integrity. RECOOP 2015 Annual Project Review 6th TriNet Meeting, Prague. RECOOP HST Association. 2015 October 15-18: 37.
- Де та коли впроваджено:** На кафедрі фізіології Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я Горбачевського в лекційному курсі та при проведенні практичних занять з розділу «Фізіологія травлення».
- Результати впровадження:** Використання результатів дослідження у навчальному процесі доповнює знання про механізми захисту слизової оболонки стравоходу та шлунка
- Термін впровадження:** 2017 р.
- Базова установа, яка проводить впровадження:** Кафедра фізіології Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я Горбачевського
- Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:
 завідувач кафедри фізіології
 з основами біоетики та біобезпеки
 ДВНЗ «Тернопільський державний
 медичний університет
 імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»,
 заслужений діяч науки і техніки України,
 д.мед.н., професор

С.Н. Вадзюк

Додаток Б 4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи Харківського національного
медичного університету
д.мед.н., проф. В. Д. Марковський
« 17 » _____ 2017

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

матеріалів дисертаційної роботи
здобувача Була Назара Степановича

1. **Найменування пропозиції до впровадження:** Роль гідроген сульфїду у механїзмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу.
2. **Установа:** Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, кафедра нормальної фізіології.
3. **Джерела інформації:**
 - Була Н. С. H₂S-похідні нестероїдних протизапальних препаратів як нові модулятори цілісності слизової оболонки стравоходу та шлунка. /Заячківська О. С., Була Н.С, Хирівська Дз., Гаврилюк О. // Праці НТШ. Мед. науки 2015.-Т.-XLI.-С. 53–63.
 - Bula N. Experimental esophagitis research: new insight on animal models and translational aspects./ Bula N., Pshyk-Titko I., Zayachkivska O. // Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific conferences Split, Croatia, May 27-June 1, RECOOP HST Association, Croatia. - 2014. - P.90.
4. **Де та коли впроваджено:** На кафедрі фізіології Харківського національного медичного університету в лекційному курсі та при проведенні практичних занять з розділу «Фізіологія травлення».
5. **Результати впровадження:** Використання результатів дослідження у навчальному процесі доповнює знання про механізми цитопротекції слизової оболонки стравоходу.
6. **Термін впровадження:** 2017 р.
7. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Кафедра фізіології Харківського національного медичного університету.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:

В.о. завідувача кафедри
фізіології Харківського
національного медичного
університету
к.біол.н., доцент _____

Л.В. Чернобай

Додаток Б 5

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

результатів дисертаційної роботи Була Н. С. за темою:
«Роль гідроген сульфїду в механізмах цитопротекції слизової оболонки стравоходу»
у науково-педагогічний процес

1. Найменування пропозиції для впровадження: цитопротекторні властивості сірководню в умовах хронічного ураження проксимального відділу травної системи нестероїдними протизапальними препаратами.

2. Ким запропоновано: Була Н. С. асистент кафедри нормальної фізіології, «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького». вулиця Пекарська, 69, Львів, Львівська область, 79000

3. Джерела інформації: матеріали дисертаційної роботи Була Н. С. представлені у наступних статтях:

- 1) Bula N, Zayachkivska O, Pavlovsky Y, Pshyk-titko I, Gavrilyuk E, Grushka O, Wallace JL. Effect of hydrogen sulfide-releasing aspirin on esophageal and gastric mucosa compromised by stress injury. The Ukrainian Biochemical Journal. 2017; 89:93-101.
- 2) Була Н, Заячківська О, Павловський Я, Пшик-Тітко І, Гаврилюк О. Цитопротекторні ефекти гідроген сульфід-спорідненої ацетилсаліцилової кислоти на слизову оболонку стравоходу (доклінічні дослідження). Сучасна Гастроентерологія. 2017;1(93):15-21.
- 3) Була Н. Експресія GCP-2 і IL-6 як інструмент оцінки впливу гідроген сульфід-асоційованого напроксену до і після індукції стресу (експериментальне дослідження). Вісник проблем біології і медицини. 2017; 1(3):107-110.

4. Де та коли впроваджено: на кафедрі медичної біології та генетики Буковинського державного медичного університету.

5. Форма впровадження: в науковій роботі кафедри, лекційному курсі та при проведенні практичних занять.

6. Результати впровадження: використання результатів наукових досліджень Н. С. Була в педагогічному процесі дозволяє розширити уявлення про механізми цитопротекції слизової оболонки стравоходу від побічного впливу нестероїдних протизапальних препаратів.

7. Зауваження та пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження

завідувач кафедри медичної біології
та генетики Вищого державного навчального
закладу України «Буковинський державний
медичний університет», д.мед.н., професор

Р.С.Булик