

УДК 612.33.014.484:612.015.113:615.276.1  
DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i3.6945

Ю. О. Склярова, Н. В. Денисенко, І. І. Ільків, І. С. Фоменко  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

## РОЛЬ ГАЗОВИХ МЕДІАТОРІВ: НІТРОГЕНУ ОКСИДУ ТА ГІДРОГЕНУ СУЛЬФІДУ В ТОНКІЙ КИШЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНГІБУВАННЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ І ЛІПООКСИГЕНАЗИ

*В експериментах ми порівнювали вплив інгібування циклооксигенази індометацином і поєданого блокування циклооксигенази та ліпооксигенази похідними 4-тіазолідинону, що вивільняють  $H_2S$  у слизовій оболонці тонкої кишки. Виявили, що дія індометацину супроводжувалась формуванням структурно-геморагічних ушкоджень, значною активацією індукцибельної NO-синтази, зниженням концентрації  $H_2S$ , зростанням концентрації ТБК-активних продуктів та активності мієлопероксидази. Використання сполук 5-(3,5-дитерт-бутил-4-гідроксибензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он та 2-[(4-хлор-фенілкарбамоїл)-метил]-3-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-акрилової кислоти не чинило ульцерогенної дії в слизовій оболонці тонкої кишки, що, ймовірно, було зумовлено вивільненням з них  $H_2S$ .*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** циклооксигеназа, ліпооксигеназа, нітрогену оксид, гідрогену сульфід, слизова оболонка тонкої кишки.

ВСТУП. Інгібітори циклооксигенази (ЦОГ) широко використовують для лікування низки запальних захворювань. Головним побічним ефектом їх дії є розвиток ерозивно-виразкових ушкоджень, локалізованих практично в усіх відділах травного тракту, в тому числі в тонкій кишці [1]. Тому актуальним напрямком сучасної науки є розробка та тестування нових ефективних препаратів, що не мають токсичної дії. Головними досягненнями на сьогодні є створення нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), що вивільняють гідрогену сульфід ( $H_2S$ ) [2, 3], і розробка інгібіторів, спроможних одночасно інгібувати ЦОГ та ліпооксигеназу (ЛОГ) [4].

Ефективність використання НПЗП, що вивільняють  $H_2S$ , пов'язують з яскраво вираженою протизапальною дією останнього [5], а також із тим фактом, що всі інгібітори ЦОГ знижують продукцію вказаного газового медіатора в травній системі, що призводить до втрати цитопротективних та регуляторних властивостей останнього [2].

Актуальність розробки нових сполук подвійного ЦОГ/ЛОГ інгібування пов'язана з тим, що за умов впливу НПЗП відбувається блокування ЦОГ шляху обміну арахідонової кислоти та зміщення її метаболізму в бік ЛОГ шляху. Таким

чином, інгібування синтезу простагландинів (ПГ) спричинює посилення синтезу лейкотрієнів (ЛТ), які, у свою чергу, можуть брати участь в ушкодженні слизових оболонок травного тракту [6]. Тому інгібітори подвійної ЦОГ/ЛОГ дії, ймовірно, матимуть підвищений протизапальний потенціал, а також очікувано знижену токсичність впливу [7]. Одним із найперспективніших інгібіторів подвійної дії на сьогодні є дарбуфелон, що у попередніх дослідженнях добре зарекомендував себе як протизапальний засіб, що не має виражених побічних ефектів на стан слизових оболонок органів травлення [8].

З огляду на вищевикладене, було прийнято рішення поєднати обидва перспективних напрямки розробки протизапальних засобів та створити і протестувати нові інгібітори, що, за рахунок вивільнення  $H_2S$  та подвійного інгібування ЦОГ і ЛОГ, володіють зниженою гастро- та ентоеротоксичністю. Зважаючи на важливу роль системи синтезу нітрогену оксиду (NO) в травній системі та її тісний зв'язок, з одного боку, з утворенням і функціонуванням  $H_2S$ , а з іншого – з функціонуванням систем ЦОГ/ПГ та ЛОГ/ЛТ, з'ясування напрямків змін основних параметрів NO-синтазної системи є актуальним питанням. Тому метою роботи було провести порівняльний аналіз впливу на зазначені процеси неселективного інгібітора ЦОГ індометацину та інгібіторів

© Ю. О. Склярова, Н. В. Денисенко, І. І. Ільків, І. С. Фоменко, 2016.

ЦОГ/ЛОГ, що належать до похідних 4-тіазолідинону та є синтезованими аналогами діючої речовини дарбуфелону, в структуру яких введено лабільну сірку, що може потенційно вивільнятися в травному тракті у вигляді  $H_2S$ .

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проводили на 32 білих щурах масою 200–230 г, яких поділили на чотири групи: 1-ша – контрольна група тварин, яким інтраперитонеально вводили фізіологічний розчин; 2-га – тварини, яким вводили неселективний інгібітор ЦОГ індометацин; 3-тя і 4-та – тварини, яким вводили інгібітори ЦОГ/ЛОГ, синтезовані на кафедрі біоорганічної, органічної та фармацевтичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького: у 3-й групі – сполуку 5-(3,5-дитерт-бутил-4-гідроксибензиліден)-4-тіоксо-тіазолідин-2-он (Les-3985), в 4-й групі – сполуку 2-[(4-хлор-фенілкарбамоїл)-метил]-3-(3,5-дитертбутил-4-гідроксифеніл)-акрилову кислоту (2С3ДНТА). Усі зазначені інгібітори вводили одноразово інтраперитонеально в дозі 10 мг/кг. У гомогенатах СOTнК вміст NO оцінювали за значенням концентрації суми нітрит-аніон+нітрат-аніон з використанням реактиву Гріса [9, 10]. Активність NO-синтаз визначали за методом [11], активність аргінази оцінювали за змінами концентрації сечовини [12]. Продукцію  $H_2S$  у гомогенатах СOTнК оцінювали в реакції з N,N-диметил-p-фенілендіаміном [13] в сироватці крові з p-фенілендіаміном. Інтенсивність процесів ліпопероксидації вивчали за вмістом ТБК-активних продуктів [14], активність мієлопероксидази – на основі реакції з о-діанізидином [15].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA "Statistica". Статистично достовірними вважали розбіжності при  $p \leq 0,05$ . Усі дослідження було виконано згідно з правилами, передбаченими Європейською комісією з нагляду за проведенням лабораторних дослідів за участю експериментальних тварин.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Неселективне інгібування ЦОГ індометацином призвело до розвитку структурно-геморагічних ушкоджень, локалізованих, головним чином, у

дистальній частині тонкої кишки. За таких умов відбувались зростання активності індукцибельної NO-синтази (iNOS) у СOTнК майже вдвічі ( $p \leq 0,01$ ) та зниження активності конститутивної NO-синтази (cNOS) на 17 % ( $p \leq 0,05$ ) (табл.). Відповідно до підвищення активності iNOS, рівень стабільних метаболітів NO (нітрит-аніона та нітрат-аніона) проявляв тенденцію до зростання. Активність аргінази знижувалась на 22 % ( $p \leq 0,05$ ). Зазначені зміни свідчать про перемикання метаболізму L-аргініну з неокисного на окисний шлях обміну.

За умов введення похідних 4-тіазолідинону, що інгібували ЦОГ і ЛОГ, – сполук 2С3ДНТА та Les-3985, не було зафіксовано жодних ушкоджень на поверхні СOTнК. Рівень активності iNOS та аргінази суттєво не відрізнявся від величин показників у тварин контрольної групи. Проте активність cNOS була на 13 % ( $p \leq 0,05$ ) нижчою порівняно з тваринами контрольної групи.

Очевидно, найбільшою мірою на показники NO-синтазної системи за досліджуваних умов впливають зміни концентрації  $H_2S$ , оскільки відомо, що між цими газовими медіаторами існують тісні взаємозв'язки, що стосуються регуляції рівня експресії відповідних ензимів та метаболізму стабільних продуктів. Тож у наших дослідженнях формування виразкових ушкоджень СOTнК при введенні індометацину супроводжувалось зниженням на 28 % рівня продукції  $H_2S$  ( $p \leq 0,05$ ) в гомогенатах СOTнК та на 7 % у сироватці крові (рис. 1). Отримані нами дані узгоджуються з даними літератури, в яких зазначено, що інгібування ЦОГ супроводжується зменшенням продукції  $H_2S$  у травній системі. Натомість застосування сполук 2С3ДНТА та Les-3985 зумовлювало збереження концентрації цього газотрансмітера на рівні контрольних величин, незважаючи на інгібування ЦОГ. Таким чином, можна стверджувати, що досліджувані похідні 4-тіазолідинонів вивільняють  $H_2S$ .

Формування структурно-геморагічних ушкоджень СOTнК при введенні індометацину супроводжувалося також зростанням активності мієлопероксидази (практично вдвічі,  $p \leq 0,01$ ), що свідчило про інфільтрацію зони ушкодження нейтрофілами, та підвищенням концентрації

Таблиця – Показники системи обміну NO за умов впливу інгібіторів ЦОГ та ЛОГ ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )

Група тварин	iNOS, нмольНАДФН <sub>2</sub> /хв·г	cNOS, нмольНАДФН <sub>2</sub> /хв·г	NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> , мкмоль/г	Аргіназа, мкмоль/хв·г
Контрольна	125,4±16,7	485,4±42,7	4,74±0,36	0,244±0,036
Індометацин	235,4±21,2**	404,5±39,7*	5,38±0,33	0,191±0,011*
2С3ДНТА	132,7±28,4	445,9±27,1	4,93±0,19	0,254±0,029
Les-3985	121,3±6,4	423,8±15,1*	4,78±0,46	0,278±0,025

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p \leq 0,01$  порівняно з показниками у тварин контрольної групи.

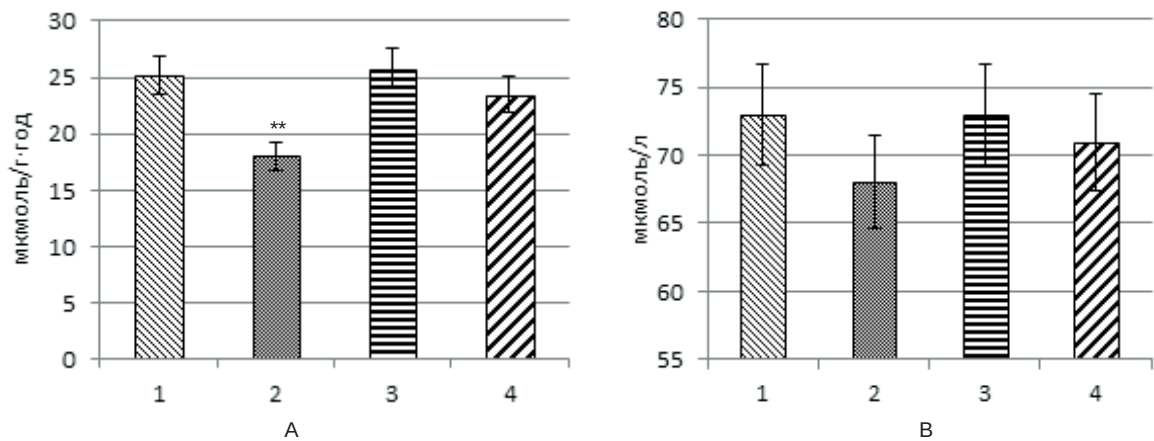


Рис. 1. Концентрація  $H_2S$  у гомогенатах СОТНК (А) та сироватці крові (В) за умов впливу інгібіторів ЦОГ і ЛОГ ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ).

Примітка. 1 – контрольні тварини; 2 – індометацин; 3 – 2С3ДНТА; 4 – Les-3985; \* –  $p \leq 0,01$  порівняно з показниками у тварин контрольної групи.

ТБК-активних продуктів (на 36 %,  $p \leq 0,01$ ), що слугувало доказом зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації та формування оксидативного стресу (рис. 2). За умов введення інгібіторів ЦОГ/ЛОГ достовірних змін активності мієлопероксидази не відбувалося, тоді як введення сполуки Les-3985 зумовлювало підвищення рівня ТБК-активних продуктів у СОТНК.

Підсумовуючи вищевикладене, слід зазначити, що відомості про роль газотрансмітерів NO та  $H_2S$  у реалізації механізмів ульцерогенезу і цитопротекції в травній системі залишаються недостатніми. З одного боку, достеменно відомі цитопротективні властивості обидвох, які вони проявляють за їх фізіологічних концентрацій, з іншого – відомі токсичні ефекти пероксинітриду, що утворюється з NO, продукту iNOS за умов формування оксидативного стресу [16], так само, як і виражений цитотоксичний вплив високих концентрацій  $H_2S$  [17]. Проте на сьогодні є мало відомостей про існування метаболічних зв'язків регуляції синтезу обидвох газотрансмітерів.

У наших дослідженнях показано, що вивільнення  $H_2S$  зі сполук 2С3ДНТА та Les-3985 впливало на активність iNOS, оскільки її рівень не суттєво відрізнявся від показників у тварин контрольної групи, незважаючи на інгібування активності ЦОГ, що в разі використання індометацину знижувало концентрацію  $H_2S$ .

Таким чином, отримані нами дані підтверджують та доповнюють існуючу теорію про існування тісного взаємозв'язку між системами обміну газових медіаторів (NO та  $H_2S$ ) – з одного боку і системами ЦОГ/ПГ та ЛОГ/ЛТ – з іншого.

**ВИСНОВКИ.** Неселективне інгібування ЦОГ індометацином зумовлює формування структурно-геморагічних ушкоджень у дистальних відділах тонкої кишки, що супроводжується активуванням процесів ліпопероксидації (зростання концентрації ТБК-активних продуктів), підвищенням активності iNOS та мієлопероксидази, зниженням рівня продукції  $H_2S$  у гомогенатах СОТНК. Використання інгібіторів ЦОГ/ЛОГ, спро-

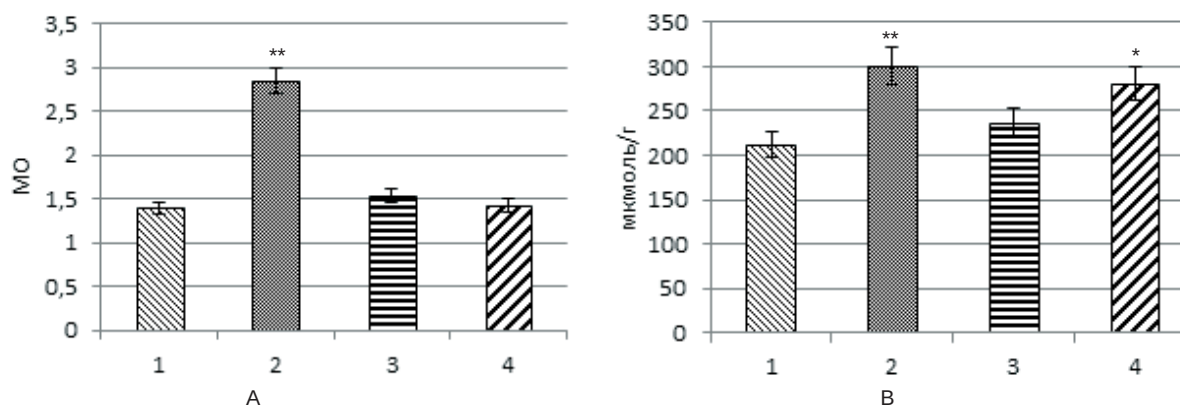


Рис. 2. Активність мієлопероксидази (А) та концентрація ТБК-активних продуктів (В) у гомогенатах СОТНК (А) і сироватці крові (В) за умов впливу інгібіторів ЦОГ та ЛОГ ( $M \pm m$ ,  $n=8$ ).

Примітка. 1 – контрольні тварини; 2 – індометацин; 3 – 2С3ДНТА; 4 – Les-3985; \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p \leq 0,01$  порівняно з показниками у тварин контрольної групи.

можних вивільняти  $H_2S$ , препаратів Les-3985 і 2СЗДНТА не чинить ульцерогенної дії в тонкій кишці (активність іNOS та аргінази, концентрація  $H_2S$  перебувають на рівні показників контрольної групи), хоч і викликає незначне активування процесів ліпопероксидації (тенденція до зростання концентрації ТБК-активних продуктів). Отже,

порівнявши дані обидвох груп препаратів, можна стверджувати, що сполуки Les-3985 та 2СЗДНТА володіють зниженою ентеротоксичністю як за рахунок ефектів, зумовлених впливом  $H_2S$ , що вивільняється з них у травному тракті, так і за рахунок одночасного інгібування прозапальних ензимів ЦОГ та ЛОГ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lim Y. J. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Enteropathy / Y. J. Lim, Ch.-H. Yang // *Clin. Endosc.* – 2012. – **45**, № 2. – P. 138–144.
2. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346) / J. L. Wallace, G. Caliendo, V. Santagada, G. Cirino // *British Journal of pharmacology.* – 2010. – **159**. – P. 1236–1246.
3. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace, M. Dickey, W. McKnight, G. M. Martin // *The FASEB Journal.* – 2007. – **21**. – P. 4070–4076.
4. Fomenko I. Changes of nitric oxide system and lipid peroxidation parameters in the digestive system of rats under conditions of acute stress, and use of non-steroidal anti-inflammatory drugs / I. Fomenko, T. Bondarchuk, V. Emelyanenko [et al.] // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences.* – 2015. – **61**, № 1. – P. 37–41.
5. Chan M. V. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments / M. V. Chan, J. L. Wallace // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2013. – **305**. – P.467–473.
6. Fomenko I. Dual acting COX/LOX nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus traditional COX-2 inhibitors / I. Fomenko, T. Bondarchuk, A. Sklyarov // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska.* – 2010. – **XXIII**, № 3 – P. 197–202.
7. Bertolini A. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks / A. Bertolini, A. Ottani, M. Sandrini // *Curr. Med. Chem.* – 2002. – **9**, № 10. – P. 1033–1043.
8. Leone S. Dual acting anti-inflammatory drugs / S. Leone, A. Ottani, A. Bertolini // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2007. – **7**, № 3. – P. 65–75.
9. Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // *Лаб. діагностика.* – 2001. – № 3. – С. 43–45.
10. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**. – P. 131–138.
11. Раваева М. Ю. Роль оксида азота в реалізації мікронаскулярних ефектів низькоінтенсивного міліметрового випромінювання / М. Ю. Раваева // *Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Серия "Биология, химия".* – 2012. – **64**, № 3. – С. 165–170.
12. Geyer J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // *Anal. Biochem.* – 1971. – **39**, № 2. – P. 412–417.
13. Digoxin increases hydrogen sulfide concentration in brain, heart and kidney tissues in mice // B. Wilinski, J. Wilinski, E. Somogyi [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2010. – **113**. – P.14–26.
14. Тимурбулатов М. А. Метод підвищення свободнорадикального окислення ліпидсодержащих компонентів крові і його діагностичне значення / М. А. Тимурбулатов, Е. І. Селезнев // *Лаб. дело.* – 1981. – № 4. – С. 209–211.
15. Bradley P. P. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation / P. P. Bradley, R. D. Christensen, G. Rothstein // *Blood.* – 1982. – **60**. – P. 618–622.
16. Zhu H. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence / H. Zhu, Y. R. Li // *Experimental Biology and Medicine.* – 2012. – **237**, № 5. – P.474–480.
17. Zaichko N. V. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role / N. V. Zaichko, A. V. Melnik, M. M. Yoltukhivsky // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – **86**, № 5. – P. 1–25.

## РОЛЬ ГАЗОВЫХ МЕДИАТОРОВ: ОКСИДА АЗОТА И СУЛЬФИДА ВОДОРОДА В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ И ЛИПООКСИГЕНАЗЫ

### Резюме

В экспериментах мы сравнивали влияние ингибирования циклооксигеназы индометацином и совместного блокирования циклооксигеназы и липооксигеназы производными 4-тиазолидинона, что высвобождают  $H_2S$  в слизистой оболочке тонкой кишки. Обнаружили, что действие индометацина сопровождалось формированием структурно-геморрагических повреждений, значительной активацией индуцибельной NO-синтазы, снижением концентрации  $H_2S$ , ростом концентрации ТБК-активных продуктов и активности миелопероксидазы. Использование соединений 5-(3,5-дитерт-бутил-4-гидроксибензильден)-4-тиоксо-тиазолидин-2-он и 2-[(4-хлор-фенилкарбамоил)-метил]-3-(3,5-дитертбутил-4-гидрокси-фенил)-акриловой кислоты не оказывало ulcerогенного действия в слизистой оболочке тонкой кишки, что, вероятно, было обусловлено высвобождением из них  $H_2S$ .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклооксигеназа, липооксигеназа, оксид азота, сульфид водорода, слизистая оболочка тонкой кишки.

Yu. O. Sklyarova, N. V. Denysenko, I. I. Ilkiv, I. S. Fomenko  
DANYLO HALYTSKY LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## ROLE OF GASOTRANSMITTERS: NITROGEN OXIDE AND HYDROGEN SULFIDE IN SMOOL INTESTINE OF RATS UNDER CYCLOOXYGENASE AND LIPOXYGENASE INHIBITION

### Summary

In experiments there were compared the cyclooxygenase inhibition by indomethacin and dual cyclooxygenase and lipoxygenase blockage by 4-thiazolidinone derivatives, capable to release hydrogen sulfide in small intestine. It was shown that indomethacin was accompanied by the formation of lesions in the distal part of small intestine, significant activation of inducible NO-synthase, the decrease of  $H_2S$  production, rise in malonic dialdehyde concentration and activity of myeloperoxidase. The administration of 5-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-4-thyoxo-thiazolidine-2-on and 2-[(4-chlor-phenyl-carbamoyl)-methyl]-3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-acrylic acid didn't demonstrate an ulcerogenic action in small intestine, that was probably caused by the release of  $H_2S$  from these compounds.

KEY WORDS: Cyclooxygenase, lipoxygenase, nitrogen oxide, hydrogen sulfide, mucosa of small intestine.

Отримано 02.08.16

Адреса для листування: Ю. О. Склярлова, вул. Хмельницького, 267/101, Львів, Україна.