

Міністерство охорони здоров'я України

**Львівський національний медичний університет імені Данила
Галицького**

РЕФЕРАТ РОБОТИ

**ДОНОРИ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ЛІКОПОДІБНІ
СПОЛУКИ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ**

АВТОРИ

1. Денисенко Наталія Валеріївна – кандидат біологічних наук, асистент кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

2. Лозинська Ірина Ігорівна – кандидат біологічних наук, асистент кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

Львів – 2021

Актуальність роботи. Серед чинників, які відіграють ключову роль у розвитку деструктивних ушкоджень гастроінтестинального тракту виділяють застосування інгібіторів циклооксигенази (ЦОГ), вплив психоемоційного стресу, порушення кишкового мікробіоценозу тощо. Механізм ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів пов'язується із зниженням продукції простагландинів шляхом інгібування конститутивної ЦОГ-1. Пригнічення синтезу простагландинів забезпечує активацію ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти та посиленого синтезу лейкаторієнів, які відіграють значну роль у патогенезі деструктивних ушкоджень органів травної системи. Із огляду на цілий комплекс патофізіологічних змін в гастроінтестинальному тракті за умов застосування нестероїдних протизапальних препаратів є актуальним пошук нових підходів щодо зниження цитотоксичності інгібіторів ЦОГ.

На сьогоднішній день, одним із важливих факторів розвитку ерозивно-виразкових ушкоджень у органах травної системи виділяють зниження синтезу ендogenous гідроген сульфід, який, як відомо, приймає участь у механізмах цитопротекції, регуляції тонуусу судин слизових оболонок органів травлення, проявляє антиоксидантні властивості. В цьому контексті виправданою є концепція використання так званих «гібридних молекул» нестероїдних протизапальних препаратів, ковалентно сполучених із газовим медіатором. Зазначеній тематиці, зокрема дослідженню дії «гібридних» протизапальних агентів, присвячено ряд фундаментальних досліджень, що свідчать про перспективу інноваційних «лікоподібних» молекул з протизапальною активністю. Було відзначено знижений гастротоксичний вплив даного класу сполук у порівнянні із дією базової молекули нестероїдного протизапального препарату, що вказує на роль газових медіаторів у розвитку патохімічних змін у органах травної системи.

Ще одним із перспективних підходів в стратегії зниження ульцерогенного впливу нестероїдних протизапальних препаратів є дослідження інгібіторів прозапальних ензимів ЦОГ та ліпооксигенази (ЛОГ), серед яких виділяють

дарбуфелон зі зниженою гастротоксичною дією. На сьогоднішній день інтенсивно досліджуються похідні 4-тіазолідиніону, які взаємодіючи з різними молекулами, володіють вираженою противірусною, протимікробною, протипаразитарною, антиоксидантною та протизапальною активністю, а також беруть участь у процесах регуляції пухлинного росту. Серед похідних 4-тіазолідиніону було виділено ряд «сполук-лідерів»: інгібітори UDP-MurNAc/L-Ala лігази, подвійні інгібітори ЦОГ-2/5-ЛОГ та сполуки, які проявляють афінитет до сімейства PPAR-рецепторів. Зважаючи на структурну спорідненість 4-тіазолідинонів до нестероїдних протизапальних препаратів, які містять тіонові групи як джерела сірководню, ряд експериментальних досліджень дозволяє також стверджувати їхню здатність бути донорами виділення H₂S за умов *in vitro* та *in vivo*.

З огляду на все вище сказане дослідження дії різних класів донорів гідроген сульфідів як потенційних «лікоподібних сполук» з протизапальною активністю є актуальним та перспективним завданням для експериментальної та клінічної гастроентерології.

Головною метою поданої роботи є дослідження дії різних за механізмом впливу інгібіторів ЦОГ/ЛОГ за умов запального процесу на морфологічний стан та біохімічні параметри слизових оболонок нижніх відділів травної системи для поглибленого розуміння патогенезу розвитку деструктивних ушкоджень. Вивчення протизапальної активності *in vivo* донорів гідроген сульфідів як потенційних «лікоподібних сполук».

Наукова новизна роботи:

В роботі здійснено комплексні гістологічні та біохімічні дослідження, що дозволили вперше відзначити неописані в літературі механізми дії різних класів донорів гідроген сульфідів за умов експериментальних запальних процесів у нижніх відділах травної системи. Проведений скринінг протизапальної активності новосинтезованих похідних 4-тіазолідиніону дозволив ідентифікувати сполуки-лідери із вираженою цитопротекторною

дією на органи травної системи, що обґрунтовує перспективу подальшого дослідження даного класу сполук.

Практичне значення роботи полягає у створенні нової концепції зниження ульцерогенної дії інгібіторів ЦОГ на нижні відділи травної системи. Отримані експериментальні дані підтверджують переваги подвійного інгібування ЦОГ-2 та 5-ЛОГ на противагу неселективному інгібуванню ЦОГ-1. Показано, що ульцерогенний вплив неселективних інгібіторів циклооксигенази ефективно нівелюється інкорпорацією молекули гідроген сульфід у структуру інгібітора.

Вперше проведено дослідження дії H_2S -вивільнюючих інгібіторів ЦОГ-2/5-ЛОГ за умов стресу та індометацин-індукованих уражень тонкої кишки та відзначено високу протизапальну активність даного класу сполук зі зниженою цитотоксичною дією.

На основі отриманих результатів поглибленого вивчення дії донорів гідроген сульфід, ідентифіковано потенційні кандидати у лікарські засоби із протизапальною активністю.

Зміст роботи. Виходячи з результатів первинного скринінгу дії нестероїдних протизапальних препаратів на верхні та нижні відділи травної системи було проведено порівняльну оцінку різних за механізмом впливу інгібіторів ЦОГ/ЛОГ на морфологічний стан та біохімічні параметри в слизових оболонках тонкої та товстої кишок щурів за умов стрес-індукованих змін та експериментального коліту.

В результаті аналізу гістологічних зрізів було встановлено виражений ульцерогенний вплив неселективного інгібітора ЦОГ-1/ЦОГ-2 – індометацину на слизову оболонку тонкої кишки, одноразове введення якого у дозі 10 мг/кг за умов стресу супроводжувалось деструктивними ушкодженнями в дистальному відділі тонкої кишки. Аналогічні зміни, а саме порушення цілісності епітеліоцитів, наявність ерозій у слизовій оболонці товстої кишки було відзначено за умов неселективного інгібування ЦОГ напроксеном як на тлі стресу так і за умов експериментального коліту.

Інгібування ЦОГ-2/5-ЛОГ сполукою 2A5DHT на тлі 5-годинного водно-імобілізаційного стресу, на відміну від впливу інгібіторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 та ЦОГ-2, призводило до зниження активності прозапальних ензимів – iNOS на 23 % ($p < 0,05$), МПО більш ніж у два рази ($p < 0,01$) та зниження процесів ліпопероксидації, про що свідчить зменшення рівня ТБК-активних продуктів на 18 % ($p < 0,05$) у слизовій оболонці тонкої кишки тварин. Отримані результати вказують на важливість інгібування як циклооксигеназного так і ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти за умов запального процесу, оскільки пригнічення синтезу простагландинів потенціює утворення лейкотрієнів, які беруть участь у процесах ульцерогенезу.

Введення інгібіторів ЦОГ/ЛОГ забезпечувало потенціювання стрес-індукованих змін та супроводжувалось зниженням рівня гідроген сульфід у плазмі крові порівняно з показниками контролю, що забезпечувало зниження цитопротекторних та антиоксидантних властивостей останнього на органи травлення.

Оскільки дія стресу так і застосування нестероїдних протизапальних препаратів призводять до порушення метаболізму газового медіатора, наступний етап дослідження включав вивчення впливу різних класів донорів гідроген сульфід на стан слизових оболонок тонкої та товстої кишок. Для дослідження було обрано сполуку АТВ-346, яка являє собою «гібридну молекулу» напроксену, ковалентно сполучену із гідроген сульфідом, а також неорганічний сульфід – NaSH.

Встановлено, що введення сполуки АТВ-346 за умов стресу супроводжувалось збільшенням кількості келихоподібних клітин та слизу у порожньому відділі тонкої кишки. У результаті морфометричного аналізу гістологічних зрізів тонкої кишки зафіксовано, що введення сполуки АТВ-346 за умов стресу призводило до зменшення висоти ворсинок на 35,5 мкм ($p < 0,01$) порівняно з водно-імобілізаційним стресом та на 43,3 мкм

($p < 0,01$) порівняно з показниками при поєднаній дії стресу та напроксену, що вказує на зниження набряку у тонкій кишці.

Використання H_2S -вмісного напроксену за умов стресу призводить до відновлення вмісту H_2S в плазмі крові до показників групи контролю – відзначено достовірне підвищення рівня H_2S в крові на 56 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками водно-імобілізаційного стресу та на 44 % ($p < 0,01$) порівняно з показниками комбінованої дії напроксену та стресу. Введення сполуки АТВ-346 за умов стресу викликало значне зниження активності мієлопероксидази – майже вдвічі ($p < 0,01$) порівняно з показниками стресу та 1,6 рази ($p < 0,05$) порівняно з показниками поєднаної дії стресу та напроксену у слизовій оболонці тонкої кишки. За умов введення АТВ-346 на тлі експериментального коліту виявлено зниження активності iNOS ($p < 0,001$), МПО ($p < 0,01$), вмісту ТБК-активних продуктів ($p < 0,01$), підвищення активності cNOS ($p < 0,05$) порівняно з параметрами експериментального коліту. Проте порівнюючи параметри системи NO-синтаза/аргіназа та процесів ліпопероксидації за умов дії напроксену та його H_2S -вмісного аналогу на тлі водно-імобілізаційного стресу достовірних змін не було виявлено, що свідчить про домінування ефекту впливу базової субстанції нестероїдного протизапального препарату.

Цитопротекторний ефект NaSH було підтверджено у слизовій оболонці товстої кишки за умов дії стресу та експериментального коліту, відзначено зниження активності запалення і активності цитокін-індукованих ферментів. На тлі експериментального коліту за умов дії NaSH знижувалась активність індукцибельної NO-синтази та мієлопероксидази ($p < 0,01$), вміст ТБК-активних продуктів ($p < 0,05$) і зростала активність конститутивної NO-синтази на ($p < 0,01$), що виявилось морфологічно зниженням індексу структурно-геморагічних ушкоджень ($p < 0,01$) порівняно з дією експериментального коліту.

Базуючись на отриманих результатах щодо більш ефективного використання подвійного інгібування прозапальних ензимів ЦОГ та ЛОГ та

переваг введення донорів гідроген сульфід (NaSH та АТВ-346), наступний етап включав дослідження дії сполук Les-5054 та Les-5055 – подвійних інгібіторів ЦОГ-2/5-ЛОГ з одночасним модулюванням вмісту гідроген сульфід. Введення досліджуваних сполук за умов стресу сприяло відновленню рівня H_2S в плазмі крові до показників контрольної групи. Слід відзначити, що як і введення сполуки АТВ-346 так і дія похідних 4-тіазолідинону супроводжувалась збільшеною продукцією слизу в порожньому відділі тонкої кишки, що обумовлене вивільненням газового медіатора та як наслідок посилення процесів проліферації епітеліоцитів. При цьому значення біохімічних показників – маркерів запалення та вільнорадикального окиснення – наближались до показників контролю, як за умов моделювання 5-годинного стресу так і при індометацин-індукованих ураженнях тонкої кишки. Отже, отримані результати свідчать, що яскраво виражений протизапальний ефект зі зниженою ентеротоксичністю досліджуваних гетероциклічних сполук Les-5054 та Les-5055 зумовлений як впливом газового медіатора, що вивільняється зі структури сполук, так і за рахунок одночасного інгібування прозапальних ензимів ЦОГ та ЛОГ.

Висновки

1. Проведено порівняльну оцінку різних за механізмом дії інгібіторів ЦОГ/ЛОГ та встановлено важливість пригнічення як циклооксигеназного так і ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти за умов запального процесу, що є одним із аргументів на користь подвійної дії сполуки 2A5DHT у зниженні цитотоксичного впливу на гастроінтестинальний тракт.

2. На основі комплексного вивчення дії різних класів донорів гідроген сульфід на морфологічний стан та біохімічні параметри у нижніх відділах органів травлення *in vivo*, окреслено переваги використання даного класу сполук та експериментально встановлено виражену протизапальну активність на фоні низьких цитотоксичних параметрів.

3. Виділено високоактивну сполуку-лідер серед похідних 4-тіазолідинону, а саме сполуку Les-5054, із вираженою цитопротекторною дією, що обґрунтовує перспективу подальшого дослідження даного класу сполук.

4. Результати наукових досліджень, що виконувались впродовж 2015-2020 років, викладено в 14 статтях, з них 8 у журнал, що включені до міжнародних наукометричних баз даних Scopus. Загальна кількість цитувань публікацій за роботою згідно баз даних Web of Science – 6, Scopus – 26, Google Scholar – 62; індекс Гірша всіх публікацій, які включені до роботи згідно баз даних Web of Science – 2, Scopus – 3, Google Scholar – 4. За результатами наукових досліджень одержано 1 патент на корисну модель.

Денисенко Н.В. _____

Лозинська І. І. _____

Перелік наукових публікацій претендентів

1. **Denysenko N.**, Sklyarov A. The action of COX/LOX inhibitors on antioxidant system and morphological state of rat's colon mucosa under the conditions of stress. **Medical and Clinical Chemistry**. 2019. Vol. 21, № 2. P. 5–11.
2. Sklyarova Y., Fomenko I., **Lozynska I.**, Lozynskiy A., Lesyk R., Sklyarov A. Hydrogen sulfide releasing 2-mercaptoacrylic acid-based derivative possesses cytoprotective activity in a small intestine of rats with medication-induced enteropathy. **Scientia Pharmaceutica**. 2017. Vol. 85, No 4. P. 35.
3. Melekh B., **Plkiv I.**, Lozynskiy A., Sklyarov A. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in rat liver exposed to celecoxib and lansoprazole under epinephrine-induced stress. **Journal Applied Pharmaceutical Science**. 2017. Vol. 7, No 10. P. 94–99.
4. **Plkiv 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**. 2017. Vol. 7, No 1. P. 199–203.
5. 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 NSAIDs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. 2017. Vol. 7, № 1. P. 13–19.
6. **Plkiv I.**, Lesyk R., Sklyarov O. The influence of novel 4-thiazolidinone derivatives in cytoprotective mechanisms of small intestine under NSAID-induced damage. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2016. Vol. 88, Special Issue. P. 99–104.
7. Pnytska Kh., Datsyuk L., Novikov V., **Denysenko N.**, Sklyarov A. The influence of 1.4-naphthoquinone derivative and of vitamin E on nitroso-oxidative processes in digestive organ mucous membranes under the conditions of cyclooxygenase blockage, and against the background of low intensity X-ray irradiation. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**. 2016. Vol. 29, № 3. P. 127–131.
8. Склярова Ю. О., **Денисенко Н. В.**, **Ільків І. І.**, Фоменко І. С. Роль газових медіаторів: нітрогену оксиду та гідрогену сульфідів в тонкій кишці щурів за умов інгібування циклооксигенази і ліпооксигенази. **Медицина та клінічна хімія**. 2016. Т. 18, № 3. С. 54–58.
9. **Денисенко Н.**, Федевич Ю., Скляров О. Моделювання активності NO-синтазної системи гідрогенсульфідом натрію у слизовій оболонці товстої кишки щурів за умов коліту. **Вісник Львівського університету: серія біологічна**. 2016. № 73. С. 285–290.
10. Fomenko I., Bondarchuk T., Emelyanenko V., **Denysenko N.**, Sklyarov P., **Plkiv I.**, Lesyk R., Sklyarov A. Changes of nitric oxide system and lipid peroxidation parameters in the digestive system of rats under conditions of acute stress, and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**. 2015. Vol. 28, No 1. P. 37–41.
11. Фоменко І. С., Корнійчук О. П., Гураль А. Р., Шичула Р. Г., **Ільків І. І.**, Скляров О. Я. Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі. **Фізіологічний журнал**. 2015. Т. 61, № 1. P. 42–49.
12. **Ільків І. І.**, Панасюк Н. Б., Білецька Л. П., Скляров О. Я. Дія H₂S-вмісного напроксену на стан системи NO-синтаза/аргіназа за умов стресу в тонкій кишці. **Медицина хімія**. 2014. Т. 16, № 4. С. 18–21.
13. **Ільків І. І.**, Панасюк Н. Б., Білецька Л. П., Скляров О. Я. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа за умов поєднаної дії гострого стресу та блокування циклооксигенази/ліпооксигенази у тонкій кишці. **Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія**. 2014. Т. 68, № 4. С. 19–25.
14. **Денисенко Н.**, Фоменко І., Федевич Ю., Скляров О. H₂S-зв'язаний нестероїдний протизапальний засіб АТВ-346 володіє зниженою гастротоксичністю порівняно з

впливом його структурного аналога напроксену. **Медична хімія**. 2014. Т. 16, № 4. С. 26–29.

Патенти

1. **Ільків І. І.**, Лесик Р. Б., Склярів О. Я. Спосіб зниження ульцерогенної дії нестероїдних протизапальних препаратів на експериментальних моделях у щурів: пат. 108412 Україна. № u 2016 01336; заявл. 15.02.2016; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 12.