

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДВНЗ «ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ» МОН УКРАЇНИ

На правах рукопису

ГОРОХОВСЬКИЙ ЄГОР ЮРІЙОВИЧ

УДК 591.132.5 : 611.018.73 : 616.341 : 546.47(043)

РОЛЬ ІОНІВ Zn^{2+} У ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ
ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ДІЇ ДИКЛОФЕНАКУ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Наукові керівники:

доктор медичних наук, професор

Ещенко В.А.

доктор біологічних наук, професор

Бовт В.Д.

Запоріжжя – 2014

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. БАР'ЄРНА ФУНКЦІЯ КИШКОВОГО ЕПІТЕЛІЮ ТА ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ЇЇ ПІДТРИМКИ ЇЇ ГОМЕОСТАЗУ.....	12
1.1 Епітеліальний бар'єр кишки та його антибактеріальна функція.....	12
1.2 Роль бактеріальної мікрофлори у підтримці й порушенні бар'єрної функції кишкового епітелію.....	18
1.3 Нестероїдні протизапальні препарати як фактор розвитку запального процесу у кишці.....	23
1.4 Роль катіонів цинку у регуляції функцій клітин, органів та систем організму ссавців.....	27
1.4.1 Лабільний цинк і внутрішньоклітинний гомеостаз цинку.....	30
1.4.2 Роль іонів Zn ²⁺ у регуляції окремих органів та систем організму.....	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	38
2.1 Умови утримання тварин, дози та шляхи введення препаратів.....	38
2.2 Морфометричні та мікроморфометричні методи досліджень.....	41
2.3 Оцінка швидкості транзиту кишкового вмісту.....	42
2.4 Оцінка бар'єрної функції кишкового епітелію.....	43
2.5 Визначення лабільного цинку та катіонних білків у клітинах Панета.....	43
2.6 Біохімічні методи досліджень.....	44
2.7 Фізико-хімічні методи досліджень.....	49
2.8 Мікробіологічний аналіз пристінного слизу клубової кишки.....	50
2.9 Статистична обробка даних.....	51
РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОЇ МОДЕЛІ АЛЬТЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ.....	52
3.1 Функціональний стан клітин Панета при альтерації слизової оболонки тонкої кишки інгібітором циклооксигенази.....	52
3.2 Вплив хлоридів ртуті та кадмію на морфологічні показники слизової оболонки тонкої кишки та вміст у секреторних гранулах клітин Панета цинку та катіонних білків.....	56
3.3 Морфологічні показники епітелію клубової кишки та функціональний стан клітин Панета щурів з аліментарним дефіцитом цинку.....	59
3.4 Морфометричні показники кишкового епітелію та функціональний стан клітин Панета щурів при синдромі надлишкового бактеріального росту в тонкій кишці.....	63

3.5 Функціональний стан клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета щурів при введенні антибіотика, інгібітору ЦОГ та цитостатичного препарату.....	69
3.6 Узагальнення результатів визначення оптимальної моделі альтерації слизової оболонки тонкої кишки.....	78
РОЗДІЛ 4. РОЛЬ ІОНІВ Zn²⁺ У ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ДІЇ ІНГІБІТОРУ ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ ДИКЛОФЕНАКУ.....	
4.1 Вміст цинку у слизовій оболонці клубової кишки, паренхімі печінки та сироватці крові щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ.....	83
4.2 Кількісні та якісні показники пристінної мікрофлори дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ.....	91
4.3 Морфофункціональні показники епітеліального бар'єру слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ.....	96
4.4 Показники стану оксидантно-антиоксидантної системи слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ.....	110
4.4.1 Прооксидантна активність слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ.....	111
4.4.2 Стан антиоксидантної системи слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ.....	123
4.5 Секреторна активність клітин Панета дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ	131
РОЗДІЛ 5. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	136
ВИСНОВКИ.....	144
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	146
ДОДАТОК 1.....	180
ДОДАТОК 2.....	181
ДОДАТОК 3.....	182

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АМП	–	антимікробні поліпептиди
АФА	–	активні форми азоту
АФК	–	активні форми кисню
ГПЛ	–	гідропероксиди ліпідів
ДЕДТК	–	диетилдитіокарбамат
ЕБК	–	епітеліальний бар'єр кишки
ЗВА	–	загальна відновлювальна активність
ЗХК	–	запальна хвороба кишечника
ІІ	–	інтерлейкін
КУО	–	колонієутворюючі одиниці
МТ	–	металотіонеїн
НПЗП	–	нестероїдні протизапальні препарати
СОД	–	супероксиддисмутаза
ТТіЦ	–	трансмембранний транспорт іонів цинку
ЦОГ	–	циклооксигеназа
М	–	середнє арифметичне
NFκB	–	ядерний фактор «каппа бі»
NOD	–	нуклеотид поєднуючий олігомеризуючий домен
SD	–	стандартне відхилення
SE	–	стандартна похибка середнього арифметичного
TLR	–	toll-подібний рецептор
Zip	–	трансмембранний протеїн імпортер цинку
ZnT	–	трансмембранний протеїн експортер цинку
λ	–	довжина хвилі світла

ВСТУП

Актуальність проблеми. Запальна хвороба кишечника є серйозною медичною проблемою, оскільки дана група захворювань починає займати лідируюче положення серед гастроентерологічних розладів. За даним Molodecky (2012) в спеціалізованій базі даних MEDLINE за період 1950-2010 рр. нараховується 8103, а в EMBASE за період 1980-2010 – 4975 посилань на роботи присвячені даній тематиці. Згідно до отриманих авторами даних, в країнах Європи щороку діагностується 505 нових випадків виразкового коліту і 322 випадків хвороби Крона на 100 000 жителів, а у Північній Америці відповідно 249 випадків виразкового коліту і 319 випадків хвороби Крона. Запальна хвороба кишечника (ЗХК) має виражену тенденцію до подальшого росту частоти захворювань, загрожуючи вже в недалекому майбутньому стати серйозною проблемою для світової медицини [237]. На жаль, епідеміологічних даних щодо захворюваності та поширеності запальної хвороби кишки в Україні немає. Але кількість хворих на виразковий коліт та хворобу Крона, які зверталися до головної гастроентерологічної установи України «Інститут гастроентерології НАМН України» за спеціалізованою допомогою та потребували стаціонарного обстеження й лікування, за останні 11 років збільшилася майже вдвічі, що дає змогу судити про загальну тенденцію про зростання захворюваності на цю патологію і в Україні [5]. Оскільки частота виникнення даної патології в цілому розподіляється по північно-південному Європейському градієнту та, відповідно, залежить від життєвого рівня населення, Economidou і Pappas (2007) вважають, що у виникненні даного захворювання, окрім генетичних особливостей окремих популяцій, істотну роль відіграють соціоекономічні чинники та фактори навколишнього середовища. Основними причинами, які можуть призводити до виникнення даних захворювань є хронічний стрес, порушення режиму харчування, низька якість їжі, харчові алергени, лікарські препарати, ксенобіотики та ін. [130, 237].

Запальна хвороба кишечника (ЗХК) це стан, який характеризується хронічним запаленням ШКТ. Виділяють два основні типи ЗХК – хвороба Крона (ХК) і виразковий коліт (ВК). Для ВК ділянки запалення в більшості

випадків обмежені товстою кишкою, а ХК хоча і може виникати у будь-якій частини ШКТ, але переважно локалізується в тонкій і товстій кишці [261]. Точна етіологія даних захворювань повною мірою не ясна, але очевидно, що в цей процес залучений епітеліальний бар'єр кишечника (ЕБК), так само як і вроджений та адаптивний імунітет, які відіграють важливу роль у патогенезі цих хвороб. В останні роки спостерігається перехід уваги дослідників від адаптивних до неспецифічних механізмів імунної відповіді, а також до місцевого антимікробного захисту організму як основних факторів, що обумовлюють виникнення та розвиток ЗХК, причому центральна роль приділяється саме епітелію, як першій лінії захисту від дії порожнинної мікрофлори, а основна увага приділяється його бар'єрній функції. У пацієнтів із ЗХК тією чи іншою мірою наявні порушення захисної функції слизової оболонки кишечника, а клінічні прояви хвороби та її локалізація прямо залежать від порушень антибактеріальної функції епітеліальної тканини [76, 242, 293]. На даний час більшість дослідників вважають, що до цих захворювань можуть приводити як порушення різноманітних складових бар'єрної функції ЕБК, так і складу кишкової мікрофлори, які є причиною запалення на тлі ослаблення вродженого антимікробного бар'єра слизової оболонки в генетично схильних індивідів. Певний внесок у виникнення запальних захворювань кишечника можуть вносити й харчові алергени [265]. Ключове питання, на яке поки ще немає остаточної відповіді полягає в тому, чи дисфункція ЕБК є первинним фактором запалення, або ж навпаки, є наслідком дії медіаторів запалення, хоча обоє ці концепції не є повністю взаємовиключними. Саме тому розуміння більш глибоких механізмів взаємодії між організмом та його бактеріальною мікрофлорою може надалі розв'язати питання про фактори, які забезпечують їх толерантне співіснування та більш точно визначити як роль місцевого антибактеріального захисту, так і вродженого та набутого імунітету у виникненні та розвитку ЗХК.

У 1963 році А. Prasad описав у народів, що населяють Іран, комплекс симптомів, які, як виявилось, є наслідком вираженого дефіциту цинку, одним з основних симптомів якого є хронічне порушення діяльності кишечника

(діарея). З того часу такими вченими як Bert Vallee, Ananda Prasad, Robert Cousins у ряді фундаментальних робіт в галузі біології металів однозначно була визначена роль цинку як необхідного кофактора і алостеричного регулятора активності ензимів, як важливого елемента факторів транскрипції і т.п. [26, 113]. Однак в останнє десятиріччя впровадження в дослідницьку практику ряду селективних флюоресцентних сенсорів цинку та методів конфокальної мікроскопії дозволило окреслити й іншу біологічну роль цинку. У сучасних публікаціях росте кількість свідочств того, що цинк виконує функцію неорганічного регулятора низки життєво важливих процесів у клітинах. Його існування у формі катіона (лабільного цинку) доведене для всіх без винятку типів клітин і таких клітинних органел як мітохондрії [325]. Вже зараз очевидно, що роль даного мікроелемента (МЕ) в клітині зазнає серйозного переосмислення, оскільки факти отримані у сучасних дослідження вказують на те, що лабільний цинк є учасником важливих сигнальних шляхів, які регулюють різні аспекти функціонування клітин [345, 343, 351, 325, 150].

Тісний взаємозв'язок між станом кишкового епітелію й цинковим статусом організму відомий досить давно. Характерним симптомом дефіциту даного мікроелемента в організмі є діарея, а Всесвітня організація охорони здоров'я рекомендує цинк як ефективний і доступний засіб терапії хронічної розладів кишечника в дітей у країнах, що розвиваються [69]. Однак з врахуванням нових даних про роль цинку в клітині постає важливе питання, чим саме може бути обумовлений позитивний ефект цинку при запальних захворюваннях взагалі й, зокрема, кишечника; в які механізми реалізації бар'єрної функції кишечника він залучений? Можливо відповідь на ці питання дозволить глибше зрозуміти значущість молекул неорганічних речовин у здійсненні й регуляції життєво важливих функцій клітин, в тому числі й епітелію кишки. Наведені вище дані визначили мету та завдання даної роботи.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є визначення ролі іонів Zn^{2+} у регуляції функціонального стану епітеліального бар'єру слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за умов блокування циклооксигенази.

Відповідно до мети дослідження було поставлено такі завдання:

1. Визначити оптимальну модель альтерації слизової оболонки тонкої кишки у щурів.
2. Дослідити зміни концентрації іонів Zn^{2+} у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки, паренхімі печінки та сироватці крові за умов одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування циклооксигенази.
3. Визначити кількісні та якісні показники пристінної мікрофлори слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування циклооксигенази.
4. Оцінити вплив на показники функціонального стану епітеліального бар'єру слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування циклооксигенази.
5. Визначити показники стану оксидантно-антиоксидантної системи слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки при одночасному модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокуванні циклооксигенази.
6. Провести оцінку секреторної активності клітин Панета дистального відділу тонкої кишки за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування циклооксигенази.

Об'єкт дослідження – регуляція цитопротекторних механізмів слизової оболонки тонкої кишки щурів.

Об'єкт дослідження – регуляція цитопротекторних механізмів слизової оболонки тонкої кишки щурів.

Предмет дослідження – роль іонів Zn^{2+} у регуляції бар'єрної функції слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки.

Методи дослідження: фізіологічні (моделювання альтерації СОТК), біохімічні (визначення активності ензимів, концентрації нітритів та іонів Zn^{2+}), фізико-хімічні (визначення концентрації гідропероксидів ліпідів, визначення концентрації іонів Zn^{2+}), морфометричні (мікроморфометричні, цитохімічні),

бактеріологічні (визначення складу пристінної мікрофлори тонкої кишки), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше встановлено, що підвищення концентрації іонів Zn^{2+} у СОТК внаслідок модулювання його трансмембранного транспорту на тлі блокування циклооксигенази призводить до різкого збільшення ступеня структурно-геморагічних ушкоджень СОТК: збільшується площа виразкових уражень та знижується бар'єрна функція.

Уперше виявлено, що модулювання іонофором цинку трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} при порушеній бар'єрній функції епітелію дистального відділу тонкої кишки призводить до збільшення в складі її пристінної мікрофлори кількості бактерій-коменсалів (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), та появи представників умовно-патогенної мікрофлори (*Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Acinetobacter haemolyticus*), що є причиною гіперактивації місцевого антибактеріального захисту СОТК та тривалого запального процесу.

Визначено, що дозозалежне модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ призводить до більш суттєвого збільшення активності мієлопероксидази та підвищення концентрації нітритів при одночасному зниженні активності супероксиддисмутази та каталази у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки на третю-сьому добу дослідження, ніж за умов звичайного блокування ЦОГ.

Показано більш значне та тривале зменшення вмісту іонів Zn^{2+} та катіонних білків у секреторних гранулах клітин Панета за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, ніж при звичайному блокуванні ЦОГ. Встановлено, що при запаленні тонкої кишки відбувається перерозподіл пулу лабільного цинку в організмі: збільшення концентрації іонів Zn^{2+} у паренхімі печінки і зниження – у сироватці крові та слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки, внаслідок чого в клітинах кишкового епітелію зменшується протизапальна дія іонів Zn^{2+} , а введення іонофору Zn^{2+} дозозалежно порушує цей процес, що у підсумку призводить до більш виражених структурно-геморагічних ушкоджень СОТК.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати поглиблюють теоретичні уявлення про роль іонів Zn^{2+} як одного з факторів регуляції запальної відповіді в слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки і свідчать про його важливе значення для реалізації механізмів місцевого неспецифічного антибактеріального захисту та підтримки сталого складу пристінної мікрофлори тонкої кишки.

Теоретично обґрунтована модель тимчасового пригнічення місцевого неспецифічного антибактеріального захисту СОТК, яка реалізується шляхом парентерального уведення іонофору цинку (диетилдитіокарбамату натрію в дозі 400 мг/кг або 1000 мг/кг). Це може бути використано для подальшого дослідження впливу різних ендогенних та екзогенних чинників на функціональний стан СОТК за умов тимчасової функціональної недостатності її антибактеріального захисту.

Запропонований спосіб гістобактеріоскопічного дослідження кишки (патент України № 61779) завдяки вдосконаленій схемі іммобілізації просторової структури пристінного слизового шару та асоційованої з ним кишкової мікрофлори в біоптатах кишки може використовуватися для дослідження процесів утворення бактеріальних біоплівок у ШКТ та механізмів взаємодії між комплексними бактеріальними угрупованнями і макроорганізмом.

Розроблений спосіб цитохімічного визначення антимікробних катіонних білків у секреторних гранулах клітин Панета на гістологічних зрізах тканини тонкої кишки (патент України № 65514), на відміну від наявних імуногістохімічних аналогів, характеризується значно меншою вартістю і може використовуватись як доступний діагностичний критерій оцінки стану неспецифічного місцевого антибактеріального захисту СОТК при проведенні наукових досліджень та в клінічній практиці.

Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі при викладанні загального та спеціального курсів лекцій на кафедрі фізіології Запорізького національного університету, на кафедрі фізіології Дніпропетровського національного університету ім. Олеса Гончара, а також на кафедрі гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію було виконано на кафедрі фізіології Запорізького національного університету в рамках держбюджетної теми «Розробка засобів визначення за допомогою хелантів-хромофорів дії стресових факторів з антропогенним навантаженням на організм людини і тварин» (№ держреєстрації – 0112U003067). Тема дисертації та її уточнена редакція затверджені на засіданні науково-технічної ради Запорізького національного університету (протокол №3 від 21.12.2009 р. та №4 від 18.12.2013 р.).

Особистий внесок дисертанта. Дисертант брав безпосередню участь у всіх серіях досліджень, виконав увесь обсяг експериментальної роботи, статистичну обробку отриманих результатів, здійснив пошук та аналіз джерел наукової літератури за темою кандидатської дисертації. Бактеріологічне визначення складу пристінної мікрофлори тонкої кишки проводилось у бактеріологічній лабораторії Запорізького обласного лабораторного центру санітарно-епідеміологічної служби України (завідувач лабораторії – лікар-бактеріолог I категорії О.Л. Ребец). Планування експериментальної роботи, аналіз та обговорення результатів, формулювання основних положень і висновків роботи проведено за участю наукових керівників: д.м.н., проф. В.А. Єщенко та д.б.н., проф. В.Д. Бовт. Участь співробітників кафедри фізіології у виконанні роботи вказана в спільних публікаціях.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 12 наукових праць, з яких 6 статей: 5 статей у вітчизняних фахових виданнях, у тому числі 2 статті у виданнях, які входять у наукометричні бази даних, 4 тези доповідей у матеріалах наукових конференцій, отримано 2 патенти на корисну модель.

Структура й обсяг роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, двох розділів власних досліджень, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (350 найменувань, із них 309 – іноземною мовою). Дисертація містить 20 таблиць, 13 рисунків, 20 фотографій. Загальний обсяг роботи становить 182 сторінки, з них основна частина дорівнює 140 сторінкам.

РОЗДІЛ 1

БАР'ЄРНА ФУНКЦІЯ КИШКОВОГО ЕПІТЕЛІЮ ТА ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ЇЇ ПІДТРИМКИ ЇЇ ГОМЕОСТАЗУ

1.1 Епітеліальний бар'єр кишки та його антибактеріальна функція

Незважаючи на високу чисельність бактерій у порожнині товстої та дистальних відділах тонкої кишки, бактеріальні інфекції його слизової оболонки досить рідке явище. Першою лінією захисту від негативного впливу порожнинної мікрофлори виступає кишковий епітелій. Це шар епітеліальних клітин, що складається з ентероцитів і секреторних клітин, більшою мірою келихоподібних і в меншій, – клітин Панета. Також у кишковому епітелії присутні нейроендокринні клітини, які секретують різні пептидні гормони [40]. Увесь цей клітинний пул, що швидко оновлюється, походить від стовбурових клітин-попередниць, які знаходяться у нижній частині кишкових крипт і в процесі диференціювання утворюють клітини інших типів [73, 105].

Цілісність ЕБК підтримується завдяки десмосомам, щільним та адгезійним міжклітинним контактам, стан яких може за певних умов суттєво змінюватися; наприклад у стадії активного запалення кишки відбувається трансепітеліальна міграція нейтрофілів у слизову оболонку, що безпосередньо пов'язано з диференціальною експресією протеїнів епітеліальних міжклітинних контактів [144].

Одношаровий епітелій, який вистилає тонку кишку ссавців, повинен виконувати дві важливі, але взаємовиключні функції: так, з однієї сторони забезпечувати абсорбцію поживних речовин, а з іншої, служити активним бар'єром між зовнішнім і внутрішнім середовищем організму. З першого погляду адаптація слизової оболонки тонкої кишки для полегшення абсорбції макро- та мікронутрієнтів шляхом збільшення площі її поверхні, повинна призводити до збільшення ризику колонізації потенційними патогенами. Але незважаючи на це кількість бактерій у тонкій кишці порівняно з товстою кишкою значно менша [46].

У підтримці сталого рівня бактеріального росту в тонкій кишці беруть участь багато факторів. До основних з них можна віднести такі прояви нормальної фізіологічної активності ШКТ як: перистальтичний рух, секреція травних соків, дія жовчних кислот, секреція келихоподібними клітинами слизу, основний компонент якого – муцин, слугує фізико-хімічним бар'єром, що захищає поверхню клітин епітелію від дії патогенної мікрофлори [240, 8]. Кишковий епітелій також приймає активну участь у рецепції мікробних антигенів, синтезі антимікробних ефекторних молекул, індукції і регуляції цитотоксичної й гуморальної імунної відповіді Т- і В-лімфоцитів. Епітеліальні клітини слизової оболонки безпосередньо синтезують велику кількість антимікробних поліпептидів (АМП), цитокінів і хемокінів, основна функція яких полягає в захисті поверхні слизової оболонки від бактерій [82].

Але оскільки між окремими видами бактерій та багатоклітинними організмами у процесі тривалої коєволюції виникли складні симбіотичні взаємовідносини, місцевий неспецифічний імунний захист повинен мати механізми, які дозволяють проводити чітку межу між бактеріями симбіонтами і патогенною мікрофлорою [231]. Рецепторами, відповідальними за розпізнавання відмінностей між цими двома групами мікроорганізмів, є патерн-розпізнавальні рецептори (ПРР), які розпізнають компоненти бактерій, так звані патогенасоційовані молекулярні патерни (ПАМП). У клітинах кишкового епітелію відбувається експресія багатьох типів типів ПРР, що дозволяє їм відповідати на дію мікроорганізмів швидким каскадом захисних реакцій, спрямованих проти патогенних бактерій. Секреція АМП клітинами кишкового епітелію відбувається після їхньої стимуляції ліпополісахаридами (ЛПС), ліпотьейхоевою кислотою, ліпідом А і мураміддипептидазою (МДП) [56]. Один із двох класів ПРР це нуклеотид-єднальний олігомеризуючий домен / домен рекрутингу каспази (NOD/CARD) – група цитоплазматичних рецепторів молекул бактеріального походження, які відіграють ключову роль у контролі процесу запалення. NOD2/CARD15 внутрішньоклітинний рецептор для МДП, невеликого біоактивного пептидоглікана, загального для всіх бактерій [238]. Генетичний аналіз показав, що NOD2 є геном

схильності до ХК [173]. У кишковому епітелії NOD2 експресується переважно у клітинах Панета [194, 115].

Іншим класом ППР є Toll-подібні рецептори (TLR). Це трансмембранні протеїни присутні на поверхні клітин або на мембрані внутрішньоклітинних органел [231]. Рецептори TLR є членами родини IL-1R; вони мають консервативну послідовність відому як Toll/IL-1R (TIR) домен, що складається приблизно із 200 амінокислот у їх цитоплазматичній частині. Позаклітинна частина TLR безпосередньо залучена у зв'язування з лігандами й, відповідно, у розпізнавання багатьох патогенних мікроорганізмів. Після зв'язування внутрішньоклітинні молекули приводять до утворення рецепторного комплексу, що включає MyD88, який активує деякі протеїнкінази, що призводить як до індукції, так і супресії ряду генів. У моделях з використанням мишей було продемонстровано, що клітини Панета розпізнають бактерії шляхом внутрішньоклітинної MyD88-залежної TLR сигналізації, що у свою чергу обмежує бактеріальну інвазію в тканині організму [122, 260, 238].

На активацію ПАМП чужорідними бактеріальними антигенами організм реагує складним комплексом взаємопов'язаних подій, спрямованих проти патогенної мікрофлори. Одним з найбільш ефективних засобів захисту слизових оболонок організму від патогенної мікрофлори є синтез та секреція антимікробних поліпептидів (АМП) – невеликих, переважно катіонних молекул із широким спектром антимікробної активності по відношенню до вірусів, Грам-позитивних та Грам-негативних бактерій, одноклітинних грибів та найпростіших (*Protozoa*) [86]. Механізм дії більшості АМП полягає у порушенні структури капсиду оболонкових вірусів, клітинної стінки бактерій або клітинної мембрани найпростіших; позитивний заряд молекули дозволяє легко зв'язуватися з негативно зарядженою поверхнею бактеріальної клітини, що при наступній інтеграції з нею призводить до гибелі мікроорганізму [261].

Експресія АМП – еволюційно консервативне явище. У кровосисних комах (москитів (*Phlebotominae*) та у мухи *Stomoxys calcitrans*) їх синтез у середній кишці активується після споживання крові, а клітини середньої кишки личинок *Manduca*

sexta містять антимікробні пептиди в гранулах. Магаїніни, – основні антимікробні пептиди шкіри земноводних (Amphibia), локалізуються також у залозах шлунка та клітинах епітеліальних складок кишки. На даний час АМП є загальновизнаними ефекторами неспецифічного антибактеріального бар'єра рослин, комах, риб, амфібій і ссавців, представляючи таким чином філогенетично широко розповсюджене явище. Синтез АМП може бути як конститутивним процесом, так і індукованою відповіддю на дію інфекції, отже секреція АМП може бути або тонічною, або ж вони можуть накопичуватися у секреторних гранулах спеціалізованих клітин, завдяки чому, наприклад, реалізується неокислювальна антимікробна дія фагоцитів, оскільки саме антимікробні поліпептиди, локалізовані в азурофільних гранулах нейтрофілів забезпечують хімічне знешкодження фагоцитованих мікроорганізмів перед фаголізосомальним злиттям. Епітеліальні АМП, з іншого боку, функціонують у позаклітинному просторі, який контактує із зовнішнім середовищем: клітини епітелію товстого кишечника, дихальних шляхів і уrogenитального тракту секретують АМП тонічно [340].

У ссавців відомі два головні класи АМП – дефенсини й кателіцидини [47, 340]. Зі слизової оболонки кишечника на даний час виділено сім α -дефенсинів і чотири епітеліальні β -дефенсина. В-дефенсини експресуються ентероцитами по всій довжині кишки, причому даний процес відбувається як під впливом різноманітних стимулів, так і конститутивно. А-дефенсини включають нейтрофільні пептиди людини 1-4, які синтезуються гранулоцитами, та дефенсини людини 5 і 6, які синтезуються клітинами Панета [137].

Клітини Панета, або більш відомі у вітчизняній літературі як ацидофільні ентероцити, являють собою одну із чотирьох основних ліній клітин кишечника ссавців. Це єдина клітинна лінія, що мігрує донизу, із зони стовбурових клітин у базальний відділ крипт [73]. Ацидофільні ентероцити виявлені в багатьох, але не у всіх ссавців. Аналоги клітин Панета існують у хребетних інших класів, а також комах. Кількість цих клітин значно варіює у різних видів ссавців: в епітелії тонкої кишки собак, котів, свиней вони відсутні, у той час, коли в людини, мавп, щурів,

морських свинок і жуйних тварин навпаки, спостерігається значна їхня кількість, яка збільшується у напрямку від дванадцятипалої до клубової кишки [226].

Основною характерною ознакою даних клітин є великі секреторні гранули. Mathan (1987) показав, що розмір гранул є ознакою зрілості клітин Панета, оскільки найбільш великі гранули характерні для клітин розташованих у самій нижній частині кишкових крипт [226]. Гранули складаються із глікопротеїнових комплексів, переважно з нейтрального муцину і характеризуються позитивною реакцією на забарвлення кислим альціановим синім, що свідчить про наявність дисульфідних груп протеїнів. Секреція вмісту гранул у порожнину крипт відбувається шляхом регульованого екзоцитозу [56, 258].

У секреторних гранулах зрілих клітин Панета містяться фактори росту, ферменти й антимікробні пептиди. Усього, за даними ряду досліджень, у цих клітинах локалізовано більш ніж 30 біоактивних молекул. Так, безпосередньо у гранулах були виявлені лізоцим (Peeters, 1975), фосфоліпаза А (Nevalainen, 1993), SLPI (Bergensfeldt, 1996), дефенсини (Ouellette, 1996, 1999), IgA (Sato, 1986b), цинк (Ещенко, 1979; Dinsdale, 1984), цинк-зв'язуючий протеїн (Fernandes, 1997), TNF- α (Beil, 1995; Schmauder-Chock, 1994), аніонний обмінник AE2, простагландин E2 (Schmauder-Chock, 1992), трипсин і трипсиноген (Bohe, 1986), рецептор ламініну (Shmakov, 2000), Rab3D (Ohnishi, 1996), фосфоліпаза В (Takemori, 1998), карбоксилестерази (Aho, 1989), дезоксирибонуклеаза I (Shimada, 1998). У цитоплазмі були локалізовані: епідермальний фактор росту (Poulsen, 1986), рецептор пролактину (Garcia-Caballero, 1986), глутатіон-S-трансфераза. З базолатеральною мембраною клітин Панета зв'язаний протеїн множинної лікарської стійкості (MRP) (Peng, 1999). У лізосомах наявний остеопонтин і цілий ряд ферментів. Білок дисульфідізомераза був виявлений в ендоплазматичному ретикулумі. Однак деякі з вказаних молекул були виявлені в клітинах при патологічних станах організму [319]. Така кількість різних біоактивних молекул у певному сенсі заважає запропонувати єдину концепцію функціональної ролі клітин Панета. Дійсно, дослідження незалежних груп учених указують і на інші можливі функції клітин Панета, крім антимікробної. Той факт, що клітини Панета

продукують епідермальний фактор росту та інші сигнальні молекули, які регулюють регуляцію клітинний цикл, робить можливим припущення про те, що вони паракринно регулюють процеси проліферації та диференціювання клітин інших ліній [319]. Гіпотеза про роль клітин Панета як важливої ланки в процесах диференціювання стовбурових клітин тонкої кишки в останні роки обговорюється більшою мірою гіпотетично. Однак Sato та ін.. (2011) довів експериментальним шляхом, що в цих клітинах відбувається синтез не тільки епідермального фактора росту, фактора росту пухлин, а також лігандів Wnt3 і Dll4 сигнального шляху Notch, які є принципово важливими для підтримки у культурі стовбурових клітин тонкої кишки лінії Lgr5 і які характеризуються тим, що здатні утворювати ворсиноподібні органоїди. Одночасне культивування стовбурових клітин із клітинами Панета значно поліпшує формування цих органел, однак відсутність клітин Панета може бути компенсована додаванням в імпульсному режимі екзогенного ліганду Wnt до поживного середовища. Генетично обумовлена відсутність клітин Панета *in vivo* супроводжується втратою стовбурових клітин Lgr5. Таким чином, роблять висновок автори, стовбурові клітини Lgr5 потребують для свого розвитку наявності сигнальних молекул, синтез яких забезпечується їхніми спеціалізованими дочірніми клітинами, – клітинами Панета [295].

Але якщо вищевикладені результати на даний час є досить спірними, то ствердження про те, що клітини Панета відіграють важливу роль у забезпеченні та регуляції механізмів місцевого імунітету підтверджено великою кількістю досліджень, і вже не викликає будь яких сумнівів.

У відповідь на вплив факторів різноманітної природи клітини Панета шляхом регульованого екзоцитозу секретують в порожнину кишкових крипт α -дефенсини та лізоцим, локалізовані в їхніх гранулах [258, 56]. Є дані досліджень, у яких показано, що антимікробні пептиди вивільняються із секреторних гранул клітин Панета тільки у відповідь на ряд певних бактеріальних антигенів, характерних в основному алохтонній мікрофлорі, тому була запропонована гіпотеза, згідно з якою функція даних клітин полягає в селективній підтримці видового складу мікрофлори тонкої кишки [296, 76]. Важливо відзначити, що кишкові дефенсини присутні також

у клітинах Панета тонкої кишки плода, а також в аксених мишей, яких утримують в стерильних умовах, що вказує на повністю конститутивний синтез цих АМП, і, отже, бактеріальна стимуляція може бути не є обов'язковою для їхнього синтезу [117].

Дефенсини також виступають у ролі ланки, яка поєднує неспецифічний і адаптивний імунітет, та реалізується головним чином через рекрутмент запальних клітин до уражених ділянок тканини. Крім того, епітеліальні клітини крипт можуть вносити вклад і в подальший рекрутинг імунних клітин шляхом секреції хемокінів [56]. Показано, що α -дефенсин клітин Панета індукує секрецію IL-8 клітинами кишки шляхом активацію р38 мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК) і NF- κ B сигнального шляху, а також через інші прозапальні цитокіни: макрофагальний запальний протеїн (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ), інтерлейкіни IL-17, IL-12, p70 [217]. Прозапальна активність дефенсинів залежить від їхньої здатності утворювати пори; так дефенсин-4 миші, не здатний утворювати пори в клітинних мембранах еукаріотичних клітин, і тому не викликає запальної відповіді. Подібним чином дефенсин людини-5 шляхом зв'язування із клітинною мембраною ентероцитів й активації секреції хемокінів IL-8 може діяти як регулятор запальної відповіді у тонкій кишці, причому залежно від його концентрації [300]. Також у більш ранніх дослідженнях повідомлялося, що дефенсини нейтрофілів людини HNP 1-3 є хемоатрактантами для моноцитів, наївних Т-клітин і незрілих дендритних клітин [160, 249].

1.2 Роль бактеріальної мікрофлори у підтримці й порушенні бар'єрної функції кишкового епітелію

У кишці ссавців нараховується приблизно від 500 до 1000 різних видів бактерій, а їх сукупна кількість становить кілька трильйонів мікроорганізмів [159, 46]. Запальний процес, як правило виникає у тих ділянках кишки, для яких характерна найвища концентрація бактерій [76, 293]. Значну роль у забезпеченні нормального функціонування епітеліального бар'єру кишки відіграє автохтонна

симбіонтна мікрофлора. Найбільш простим механізмом, завдяки якому автохтона мікрофлора може робити внесок у підтримання гомеостазу кишки є конкурентні відносини між окремими видами бактерій. У ряді досліджень показано, що деякі бактерії коменсали можуть пригнічувати колонізацію патогенами шляхом конкурування за лімітовані джерела поживних речовин у кишці. Наприклад, *Escherichia coli* успішно конкурує за органічні кислоти, амінокислоти та інші поживні речовини з патогенним ентерогеморагічним штамом *E. coli*, серотип O157:H7 [108]. Але й патогенні бактерії також мають власні стратегії, які дозволяють їм одержувати конкурентну перевагу над бактеріями коменсалами. Одна з таких стратегій – використання поживних речовин, недоступних для коменсалів. Так, наприклад, споживання вуглеводів між патогенними та не патогенними штамми *E. coli* суттєво відрізняється [211]. Вищезгаданий ентерогеморагічний штам *E. coli* O157:H7, на відміну від більшості не патогенних штамів, у якості джерел вуглецю та азоту може використовувати галактозу, гексуронати, маннозу, рибозу та етаноламін, які вивільняються у порожнину кишки внаслідок постійного оновлення пулу клітин кишкового епітелію [211]. Інша стратегія патогенних бактерій полягає у індукції запалення завдяки властивим їм факторам вірулентності. Наприклад інфекційний процес викликаний *Salmonella typhimurium* призводить до продукування нейтрофілами АФК, які сприяють перетворенню ендogenous тіосульфату у тетратіолат, що у свою чергу селективно збільшує темпи росту вказаного патогенного мікроорганізму [163].

Іншим аспектом позитивного впливу автохтонної мікрофлори є те, що вона здатна покращувати фізичні показники стану епітеліального бар'єру кишки. Секреція слизу епітелієм кишки є одним з найважливіших захисних механізмів, спрямованих проти інвазії патогенних бактерій, оскільки їх прикріплення до поверхні ентероцитів є критичним етапом для початку інфекційного процесу [293]. У дослідженні Fetersson, J. et al. (2010) показано, що товщина шару слизу на поверхні епітелію кишки гнотобіонтних тварин значно менша, ніж у тварин яких утримують не у стерильних умовах, однак швидко збільшується при пероральному введенні таких бактеріальних продуктів як ліпополісахариди та пептидоглікани

[180]. Це свідчить про те, що саме мікрофлора може впливати на процеси синтезу та секреції слизу клітинами кишкового епітелію. Окрім цього метаболіти, які утворюються автохтонною мікрофлорою у процесі життєдіяльності, також можуть позитивно впливати на бар'єрну функцію епітелію. Наприклад, коротколанцюгові жирні кислоти, які продукуються бактеріями родини *Bifidobacterium*, значно підвищують здатність епітелію запобігати транслокації веротоксину, який продукується серотипами *E. coli* O157:H7 та O104:H4 [83].

Автохтонна мікрофлора також впливає на місцевий неспецифічний антибактеріальний захист, головним чином шляхом модулюванні процесів синтезу та секреції клітинами епітелію кишки мікробіцидних факторів. Наприклад, один з численних антимікробних поліпептидів секреторних клітин Панета – REG3G виконує функцію регулятора взаємовідносин між організмом та мікрофлорою завдяки його антибактеріальній активності, спрямованій переважно проти Грам-позитивної мікрофлори [313]. Делеція гену *MyD88* у клітинах кишкового епітелію порушує синтез REG3G, що свідчить про те, що розпізнавання бактеріальної мікрофлори TLR-рецепторами є одним з вірогідних факторів, який опосередковує експресію цих антимікробних поліпептидів [313]. Також важливо зазначити, що порушення синтезу REG3G значно зменшує резистентність мишей до інфекцій, викликаних такими кишковими патогенами як *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* та *Salmonella enterica* [243, 323, 188].

Крім цього автохтонна мікрофлора здатна не тільки підсилювати неспецифічну імунну відповідь макрофагів та дендритних клітин власної пластинки кишки на дію патогенів, а й забезпечувати їх імунологічну несприйнятливість до бактерій коменсалів, що є надзвичайно важливим для підтримки гомеостазу кишки [250]. Резиденті фагоцити кишки характеризуються зниженою чутливістю до мікробних лігандів, специфічних для бактерій коменсалів, і тому не продукують біологічно значущих рівнів прозапальних молекул під час стимуляції антигенами автохтонної мікрофлори [250, 55]. Такий стан зниженої чутливості, який можливий лише за умов інтактного епітеліального бар'єру, підтримується завдяки тому, що резиденті бактерії коменсали не можуть індукувати процесінг про-ІЛ-1 β до

біологічно активної форми ІЛ-1 β у резидентних мононуклеарних фагоцитах [250]. При інфекції навпаки, такі патогени як *Salmonella typhimurium* та *Pseudomonas aeruginosa* можуть індукувати процесінг про-ІЛ-1 β до ІЛ-1 β внаслідок активації каспази-1 у складі NLRC4 інфламосоми. Це відбувається тому, що на відміну від коменсалів ці патогенні бактерії експресують секреторну систему III типу (інжектосому), яка робить можливою перенесення у цитозоль клітин флагеліна – агоніста NLRC4; активована у такий спосіб NLRC4 інфламосома шляхом протеолітичного розщеплення перетворює про-ІЛ-1 β у активний ІЛ-1 β . Тому NLRC4-залежне продукування резидентними фагоцитами ІЛ-1 β є специфічною відповіддю, яка здатна проводити чітку межу між патогенною мікрофлорою та бактеріями коменсалами [250].

Але автохтонна мікрофлора може впливати не тільки на неспецифічну, а й на адаптивну імунну систему. Наприклад, диференціювання Т-хелперів Th17, індуковане колонізацією сегментованими філаментозними бактеріями, сприяє захисту проти інфекційного процесу, викликаного *C. rodentium* [185]. Індукований мікробіотою розвиток регуляторних Т-лімфоцитів (Т-супресорів) зменшує ступень ушкодження кишки, спричинений неадекватно сильною імунною відповіддю на дію патогенів. Наприклад *Bifidobacterium infantis* збільшує кількість Т-лімфоцитів, які зменшують тяжкість перебігу кишкової інфекції, викликаной *Salmonella typhimurium* [107]. Бактерії коменсали також сприяють синтезу ІgА та утворенню CD4⁺ Т лімфоцитів, дія яких спрямована проти їх власних антигенів [52, 267, 57].

Враховуючи вищевикладені, доволі складні механізми взаємодії між організмом та мікрофлорою зазначимо, що остання може чинити як позитивний так і негативний вплив на розвиток запалення у кишці [7]. Дійсно, кишкова мікрофлора є важливим фактором для початку або підсилення хронічного запального процесу у кишці [7]. На це вказують результати досліджень, згідно до яких порушення механізмів розпізнавання та регуляції чисельності бактерій коменсалів також є суттєвим фактором розвитку запальної хвороби кишки [231]. Багато генів – маркерів схильності до запальної хвороби кишки приймають активну участь у регуляції взаємодії між організмом та його мікрофлорою [101]. Наприклад

внутрішньоклітинний рецептор мураміддипетиду бактеріальних клітин – NOD2, активна експресія якого відбувається у клітинах Панета, є маркером схильності до хвороби Крона [171]. Повідомлялося про зменшення експресії дефесинів клітинами Панета у осіб із характерними для хвороби Крона мутаціями гену NOD2 [142]. Нокаутовані NOD2 $-/-$ миші мають порушену антимікробну функцію клітин Панета, що призводить до збільшення бактеріального росту у клубовій кишці, і може бути причиною розвитку запальної хвороби кишки [251]. Мутантні за геном *Atg1611* миші характеризуються порушенням утворенням гранулу клітинах Панета, подібно до того, що спостерігається у пацієнтів з хворобою Крона із гомозиготною мутацією гена *Atg1611* [49]. У *Atg1611* мишей порушенням процесу утворення гранул може бути спровоковано вірусною кишковою інфекцією; також ці миші характеризуються підвищеною чутливістю до хімічно індукваного коліту. Таким чином, дефекти у механізмах розпізнавання та регуляції численності бактерій мають зв'язок із підвищеною вірогідністю розвитку запальної хвороби кишки [331].

І хоча за деяких умов бактерії комменсали можуть бути причиною розвитку запалення у кишці, вони також можуть бути й важливим фактором зниженої сприйнятливості кишки до запалення [283]. Захисний ефект бактерій комменсалів продемонстрований у дослідженнях у яких показано, що гнотобіотичні миші більш чутливі до індукваного декстрансульфатом коліту, ніж миші, які утримуються за звичайних умов [125]. Уведення ліпополісахаридів (лігандів TLR4) або цитозин-фосфат-гуанін-динуклеотидів, (лігандів TLR9), захищає мишей від коліту шляхом активації бар'єрної функції кишкового епітелію, що у свою чергу обумовлюється збільшенням експресії цитопротекторних протеїнів теплового шоку [283, 223]. До того ж, синтез В-лімфоцитами захисних імуноглобулінів IgA та IgM при активації MyD88 сигнального шляху пригнічує небезпечну дисемінацію бактерій комменсалів після ушкодження товстої кишки [66]. Бактерія комменсал людини *Bacteroides fragilis* також захищає і мишей від коліту шляхом сприяння акумуляції IL-10 продукуючих Т-супресорів у товстій кишці [50]. Стимуляція бактеріями комменсалами сигнального шляху MYD88 також обмежує міграцію CX3CR1+ мононуклеарних фагоцитів, які захоплюють неінвазивні бактеріальні клітини у

лімфатичні вузли мезентерію. Отже порушення складу аутохтонної мікрофлори та/або дизрегуляція MyD88 сигнального шляху може бути причиною надлишкової стимуляції В- та Т-лімфоцитів у лімфатичних вузлах мезентерію кишки, що може зробити суттєвий внесок у розвиток її запалення [234].

1.3 Нестероїдні протизапальні препарати як фактор розвитку запального процесу у кишці

Нестероїдні протизапальні препарати (НПВП) є одними з найбільш часто призначуваних лікарських препаратів у світі, що обумовлено їх вираженими анальгетичними та протизапальними властивостями. Однак НПВП мають суттєві обмеження у застосуванні, обумовлені їх шлунково-кишковою токсичністю. Лише із появою нових методів діагностики, у першу чергу капсульної ендоскопії, НПВП-індукована ентеропатія почала привертати значну увагу дослідників. Дослідження із використанням цього методу дозволили встановити, що частота виникнення ушкоджень кишки у здорових волонтерів коливається у межах від 55% до 75% [222, 332, 53, 126].

НПВП-асоційована ентеропатія є причиною високого рівня захворюваності та навіть летальних випадків, і тому має важливе клінічне значення, представляючи собою суттєву проблему для системи охорони здоров'я [119, 297]. Так наприклад, у Сполучених штатах Америки середня кількість хворих, госпіталізованих внаслідок виникнення тяжких НПВП-індукованих ушкоджень ШКТ дорівнює більше ніж 100 000 пацієнтів на рік та є причиною щонайменше 16 500 смертей щорічно [178].

Переважаюча більшість попередніх досліджень порушень ШКТ при тривалому прийомі НПВП була присвячена НПВП-індукованій гастропатії, але зараз увага дослідників у більшій мірі зосереджена на тонкій та товстій кишці. Добре відомо, що інгібітори протонної помпи (ІПП), які значно зменшують ризик виникнення гастродуоденальних ушкоджень при прийомі НПВП, не захищають від НПВП-індукованої ентеропатії [165]. До теперішнього часу ще немає достатньо ефективних препаратів, здатних як запобігати, так і відновлювати ушкодження

кишки, викликані прийомом НПВП. Тому важливим є більш глибоке розуміння механізмів ушкодження товстої та дистальних відділів тонкої кишки за дії НПВП, оскільки лікарі-клініцисти, і у першу чергу гастроентерологи, повинні мати чітке розуміння про механізми виникнення гастроентерологічних ушкоджень за дії НПВП. Проте варто зазначити, що хоча повної картини патогенезу НПВП індукованої ентеропатії на даний момент немає, існують переконливі свідчення про участь ряду факторів, які запобігають або навпаки, сприяють виникненню НПВП індукованої ентеропатії [166].

Інгібітори протонної помпи. Як вже згадувалось, остаточно не з'ясовано, яким чином НПВП ушкоджують нижні ділянки ШКТ. На відміну від шлунка немає свідчень про те, що шлункова кислота відіграє роль у патогенезі НПВП-індукованої ентеропатії [273, 307, 215]. Деякі фармацевтичні компанії розробляють препарати які містять одночасно НПВП (напроксен, аспірин або ібупрофен) та інгібітори протонної помпи (омепразол, езомепразол, лансопразол) [178]. Інші компанії комбінують НПВП із великими дозами антагоністами H₂-рецепторів. У обох цих випадках ці нові препарати виявляють зменшення кількості випадків НПВП-індукованої гастропатії, проте не ентеропатії. Тривалий прийом інгібіторів протонної помпи навпаки, може збільшувати ризик виникнення інтра-абдомінальних інфекцій, у тому числі й бактеріального перетоніту та псевдомембранозного коліту [183, 278]. Більш того, інгібітори протонної помпи можуть навіть загострювати перебіг НПВП-індукованої ентеропатії. Експериментально було доведено, що хронічне пригнічення секреції кислоти у шлунку порушує баланс кишкової мікрофлори, а це у наслідку є несприятливим фактором перебігу НПВП-індукованої ентеропатії [279].

Активність циклооксигенази. Одним із запропонованих механізмів НПВП-індукованої ентеропатії є порушення захисних механізмів слизової оболонки кишки внаслідок пригнічення циклооксигенази (ЦОГ), що у наслідку призводить до дефіциту простагландинів. Подібно до шлунку, селективні блокатори ЦОГ-2 викликають значно менш виражені ушкодження кишки, ніж неселективні НПВП [290, 220]. Goldstein та ін. [330] отримали результати про те, що 2-х тижневий курс

лікування целекоксибом, селективним інгібітором ЦОГ-2, призводить до значно менш виражених ушкоджень, ніж неселективний інгібітор ЦОГ напроксен. Однак Maiden та ін. [219] у власному дослідженні не знайшли відмінностей у частоті виникнення ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки у пацієнтів, які тривалий час приймали як неселективні НПВП, так і селективні інгібітори ЦОГ-2. І хоча коксибс (селективний інгібітор ЦОГ-2) дійсно характеризується меншою здатністю до виразкоутворення у ШКТ, ніж неселективні НПВП, проте він також може викликати суттєві побічні ефекти з боку ШКТ [166].

Простагландини. Важливо зазначити, що навіть суттєве пригнічення синтезу простагландинів у тканині кишки не обов'язково призводить до виразкоутворення та кровотеч. Однак, як було експериментально доведено, екзогенні простагландини зменшують ступінь викликаних НПВП ушкоджень кишки. Vjarnason та ін. [235] продемонстрували значне зменшення НПВП-індукованої кишкової проникності при застосуванні мізопростолу (синтетичного аналогу простагландину E). Fujimoto та ін. [274] показали позитивний ефект мізопростолу, який полягав у зменшенні тяжкості уражень слизової оболонки тонкої кишки у здорових волонтерів при 2-х тижневому курсі диклофенака. Однак використання мізопростолу у клінічній практиці має суттєві обмеження, оскільки даний препарат призводить до таких симптомів як діарея, біль у животі, диспепсії та блювання.

Кишкова мікрофлора. Важливу роль у патогенезі НПВП ентеропатії відіграють Грам-негативні бактерії [291]. Уведення НПВП гризунам призводить до суттєвих змін у складі кишкової мікрофлори, що у свою чергу є причиною виникнення виразок слизової оболонки тонкої кишки [291, 193]. Також повідомлялося про те, що застосування антибактеріальних препаратів широкого спектру дії може зменшувати тяжкість НПВП-індукованої ентеропатії [233]. У гнотобіонтних мишей, НПВП-індукована ентеропатія розвивається лише тоді, коли ШКТ цих тварин колонізують такими мікроорганізмами як *Escherichia coli* або *Eubacterium limosum*, а при колонізації пробіотичними штамами *Bifidobacterium adolescentis* або *Lactobacillus acidophilus* подібний патологічний стан навпаки, не

розвивається. НПВП, збільшуючи кишкову проникність сприяють активації Toll-подібних рецепторів, які, як відомо, відіграють ключову роль у виникненні ушкоджень слизової оболонки кишки через механізм стимуляції запальної відповіді [253].

Жовч та жовчні кислоти. Жовч також відносять до важливих патогенетичних факторів розвитку НПВП-індукованої ентеропатії. Перев'язування жовчних проток запобігає кишково-печінковій рециркуляції НПВП і у такий спосіб запобігає ушкодженню кишки [286]. НПВП самі по собі здатні ушкоджувати клітини кишкового епітелію, але ушкодження клітинних мембран ентероцитів підсилюються при комбінованій дії НПВП та жовчі [132]. Ця цитотоксична дія НПВП у комбінації із натуральною жовчю або синтетичними жовчними кислотами може бути попереджена додаванням фосфатиділхоліну [74]. У дослідженні Lim та ін. (2012) показано, що комбінований препарат, який містить фосфатиділхолін та індометацин не викликає ушкоджень тонкої кишки [182]. Фосфоліпиди поверхневого слизу слизової оболонки кишки формують незмочуваний, гідрофобний шар, який обмежує потрапляння до поверхні ентероцитів кислот, жовчі та інших подразників. Комбінування НПВП з екзогенним фосфатиділхоліном запобігає збільшенню зволоження поверхні слизової оболонки і захищають її від ушкодження НПВП [214, 253].

Пробіотики. У ряді досліджень розкрито значення пробіотиків у запобіганні розвитку індукованої індометацином або аспірином ентеропатії в умовах *in vitro* та у тваринних моделях [136, 204, 205, 157, 106]. Однак ці результати ще частково неповні. У дослідженні H. Endo et al., 2011 було показано, що *Lactobacillus casei* зменшує тяжкість уражень слизової оболонки кишки у хворих, які тривалий час приймають аспірин у низьких дозах [136]. Однак докази захисної ролі пробіотиків залишаються недостатньо переконливими. Потрібні великі, добре сплановані дослідження із використанням різних штамів пробіотичних мікроорганізмів для підтвердження їх захисної ролі при прийомі НПВП [215].

1.4 Роль катіонів цинку у регуляції функцій клітин, органів та систем організму ссавців

Цинк є незамінним мікроелементом, а його вміст в організмі ссавців у середньому становить 30 мг/кг маси тіла. Цинк приймає участь у широкому колі різноманітних фізіологічних процесів, будучи при цьому їхнім невід'ємним і незамінним компонентом, а при його дефіциті спостерігаються порушення багатьох систем організму, що вказує на фундаментальну роль цинку в клітинному метаболізмі [167].

Істотною відмінністю цинку від інших есенційних МЕ (Fe, Cu, Mn, Cr, Co) і умовно есенційних МЕ (V і Ni), полягає в тому, що атоми цинку мають заповнену d орбіталь (d10) і тому не беруть участь у реакціях окиснення-відновлення. І хоча цинк є невід'ємним компонентом деяких окисно-відновних систем, наприклад алькогольдегідогенази, у цих випадках він діє не як переносник електронів, а як сильна льюїсовська кислота, тобто речовина, що здатна приймати електронну пару від основи, утворюючи при цьому ковалентний зв'язок. Відсутність окисно-відновної активності забезпечує стабільність катіона цинку $[Zn^{2+}]$ у біологічних середовищах. Тому він є ідеальним металом-кофактором для реакцій у яких необхідна участь редокс-стабільного іона, що функціонує як каталізатор типу льюїсовської кислоти; прикладом таких реакцій є гідроліз, реакції переносу й приєднання до подвійних зв'язків [26, 89].

Наступна особливість цинку полягає в тому, що при утворенні координаційних зв'язків з атомами кисню, азоту або сірки він не виявляє виражених переваг жодному із цих хімічних елементів. Даний факт має принципово важливе біологічне значення, оскільки в ділянках білків, що зв'язують цинк, іони цього металу можуть утворювати координаційні зв'язки з багатьма амінокислотними залишками ланцюгів протеїнів, включаючи азот гістидину, кисень аспартату або глутамату та сірку цистеїну; серед них найбільше часто зустрічаються гістидин і цистеїн. Значно рідше спостерігаються ліганди, що включають гідроксил тирозину,

карбонільний кисень поліпептидного остову білка та карбонільний кисень аспарагіну або глутаміну [158].

Як компонент протеїнів цинк може виконувати каталітичну, сокаталітичну або структурну роль. У каталітичній ділянці, іони цинку беруть безпосередню участь у процесах утворення, або навпаки, – розриву хімічних зв'язків молекули субстрату. У сокаталітичних ділянках декілька атомів металу зв'язані один з одним; один виконує каталітичну роль, а інші – підсилюють каталітичну активність ділянки. І нарешті, у структурних цинкових ділянках, атоми цинку головним чином стабілізують третинну структуру ензиму або структурного протеїну подібно дисульфідним зв'язкам. Дуже важливо відзначити, що у всіх цих випадках видалення цинку може привести до повної інактивації металоензиму [225].

Цинк також необхідний для нормального функціонування і стабілізації плазматичних мембран клітин [169]. Аліментарний (харчовий) дефіцит цинку в щурів є причиною змін у структурі та функції мембран еритроцитів. При даному стані в клітинах червоної крові щурів спостерігається зниження концентрації цинку зв'язаного з мембраною, тоді як концентрація даного МЕ в загальному гемолізаті залишається незмінною. Еритроцити тварин з дефіцитом цинку більшою мірою зазнають лізису в гіпотонічному розчині хлориду натрію, а також у присутності лаурилсульфату натрію, лаурил-*n*-саркозину натрію, диметилсульфоксиду і мелітину; більш вразливі до H_2O_2 -індукованого гемолізу та мають меншу здатність до фільтрації, ніж еритроцити контрольних тварин [200]. У результаті численних дослідів в умовах *in vitro* було зроблене припущення, що цинк виконує важливу роль у регуляції фосфорилування і дефосфорилування білків мембрани. Також цинк є кофактором ензимів плазматичної мембрани, які переносять фосфатні групи; нуклеозидфосфорилаза, яка відщеплює фосфатні групи від нуклеозид-5'-монофосфату є металоензимом, що містить цинк. Лужна фосфатаза – фермент плазматичної мембран, також є металоензимом, у якому цинк виконує як каталітичну, так і структурну функцію. Зниження концентрації цинку зменшує активність обох цих металоензимів [264].

Дефіцит цинку призводить до зниження його концентрації в мембрані еритроцита, однак концентрація в цитозолі залишається незмінною. При дослідженні цього факту були отримані дані про те, що дефіцит цинку може бути прямою причиною ушкодження структури й функцій цитоскелету еритроцитів і інших видів клітин. Hesketh і Oteiza продемонстрували, що низька концентрація цинку є причиною порушення процесу складання мікротрубочок у неочищених екстрактах тубуліну. Було експериментально доведено, що очищені білки цитоскелету – спектрин, актин і тубулін, зв'язують цинк, який є ефектором процесу полімеризації тубуліну, а також призводить до формування й стабілізації актинових філаментів в умовах *in vitro* [65].

У дослідженні Finamote (2008) було показано, що дефіцит цинку призводить до ушкоджень щільних і адгезійних контактів епітеліальних клітин тонкої кишки лінії Caco-2, можливо внаслідок делокалізації білків – оклюдину та E-кадгерину, що свідчить про вплив катіона даного МЕ на стан адгезійних контактів у первинній культурі епітеліальних клітин. У такий спосіб цинк відіграє важливу роль у забезпеченні нормального функціонування мембранного бар'єра тонкої кишки [344].

Загальною ознакою дефіциту цинку є порушення поглинання кальцію клітинами при їх стимуляції позаклітинними сигналами (гормонами, мітогенами або фізичними подразниками). Причиною цього, на думку O'Dell може бути порушення функції SH-залежних кальцієвих каналів плазматичної мембрани, що виникає внаслідок зменшення концентрації цинку в плазмі крові та позаклітинному середовищі у тварин з дефіцитом цинку. Їм запропонована модель SH-залежного кальцієвого каналу, згідно з якою іон цинку має зв'язок з SH-групою з відносно низькою спорідненістю. Сила зв'язування повинна бути такою, що коли концентрація вільного цинку в мікросередовищі знижується до рівня, який спостерігається в позаклітинних рідинах тварин з дефіцитом цинку, то відбувається істотна дисоціація цинку. Як у й випадку металотіонеїну, а також ензиму δ-амінолевуленатдегідратази, при відсутності зв'язаного цинку, SH-група білків плазматичної мембрани легко окислюється, утворюючи дисульфідний зв'язок, який

може залучати іншу SH-групу в межах білка або низькомолекулярного SH-з'єднання, наприклад відновленого глутатіону (GSH), у звичайних умовах не взаємодіючого з білками. Згідно із цією моделлю, перша, лімітуюча біохімічна функція цинку при виникненні його дефіциту скоріше має відношення до захисту мембранних білків від процесів окиснення, а не до втрати цими білками каталітичної ролі [255].

Таким чином, роль цинку в підтримці структури й функції клітинних мембран реалізується переважно шляхом взаємодії з ензимами та структурними протеїнами плазматичної мембрани, оскільки він є невід'ємною їхньою частиною; втрата цинку призводить до порушення нормального функціонування ензимів, що проявляється у втраті їх активності або порушенні стабільності мембран клітин. Однак, деякі патологічні прояви дефіциту цинку не можуть бути пояснені тільки порушеннями активності металоензимів або структурних білків. Для з'ясування етіології цинк-дефіцитних станів на молекулярному рівні були запропоновані й інші теорії, що враховують критичні функції цинку, які відрізняються від його біохімічної ролі як специфічного кофактора металоензимів або стабілізатора структури протеїнів.

1.4.1 Лабільний цинк і внутрішньоклітинний гомеостаз цинку

Незначна частина цинку, що перебуває в катіонній формі Zn^{2+} , відноситься до так званого “вільного” або “лабільного” цинку і приймає участь у внутрішньоклітинній сигналізації. З методологічної точки зору він визначається як: «пул здатний утворювати хелатні (кешньоподібні) комплекси з рядом хімічних сполук, що обумовлює можливість його визначення з використанням хімічних або генетичних сенсорів» [48].

Лабільний цинк у значній концентрації (100-300 мкМоль) міститься в секреторних гранулах ряду клітин (нейрони гіпокампа, В-клітини підшлункової залози, клітини підщелепних слинних залоз, клітини Панета, клітини епітелію вивідних проток простати), і утворює легко дисоціюючі сполуки з поліпептидами секреторних гранул цих клітин [149, 12]. Про наявність лабільного цинку в

клітинах Панета епітелію тонкої кишки вперше повідомив М. Mager у 1953 році [221]. Присутність цинку була розцінена їм як імовірний екскреторний механізм, оскільки продукт гістохімічної реакції виявляли лише у тварин, яким внутрієнно вводили ацетат цинку.

Внутрішньоклітинний гомеостаз лабільного цинку. Внутрішньоклітинна концентрація цинку підтримується шляхом скоординованої активності великого сімейства протеїнів – транспортерів цинку (ZnT та ZIP), а також таких протеїнів як металотіонеїни (MT). Транспортери цинку кодуються двома сімействами генів (SLC): SLC30 (також відомі як експортери цинку або ZnT1-10) і SLC39 (відомі як імпортери цинку або ZIP1-14) [316]. ZnT транспортери зменшують концентрацію цинку в цитоплазмі шляхом забезпечення потоку цинку в міжклітинний простір, тоді як ZIP транспортери навпаки, збільшують концентрацію цинку в цитоплазмі шляхом забезпечення потоку цинку з позаклітинних і, можливо, везикулярних сховищ (цинкосом) у цитоплазму [218].

Роль металотіонеїнів у забезпеченні внутрішньоклітинного гомеостазу іонів Zn^{2+} . Металотіонеїни (MT) велика група протеїнів, які можуть координувати до 7 моль Zn^{2+} /моль MT завдяки своїм цистеїновим залишкам. MT беруть участь у детоксифікації важких металів, таких як ртуть та кадмій, алкилюють протипухлинні препарати, є пастками вільних радикалів, захищають від ушкоджень ДНК, оксидативного стресу і апоптозу [210]. У ссавців відбувається експресія як мінімум чотирьох ізоформ MT-1, MT-2, MT-3 і MT-4. У людини відомі 16 генів MT, які локалізовані в XVI хромосомі і більшість із них пов'язані із MT-1 ізоформою даного протеїну [120]. MT-1 і MT-2 експресуються в багатьох тканинах, але найбільше активно в печінці, підшлунковій залозі, кишечнику та нирках [247]. MT-3 і MT-4 – малі ізоформи, які переважно експресуються в головному мозку (MT-3) і деяких епітеліальних клітинах (MT-4) [100]. На субклітинному рівні MT локалізується в мітохондріях, цитозолі, ядрі та у міжклітинному просторі [224]. Відновлювальний потенціал MT (менш ніж -366 мВ), обумовлює його високу чутливість до фізіологічних оксидантів [78]. MT чутливий до змін клітинного окиснювально-відновлювального балансу й збільшення концентрації АФК і АФА може

окислювати або транснаїтрозувати (переносити NO⁺ від S-нітрозотіолів до інших ендогенних тіолів) цистеїнові залишки його цинк-сірчаних кластерів, призводячи до вивільнення цинку. Отже МТ може виступати в якості сенсора і перемикача, об'єднуючого зміни окисно-відновного балансу з коливаннями концентрації лабільного цинку в цитозолі клітини [48, 103].

Імпортери іонів Zn²⁺. У ссавців відомі 14 членів родини ZIP. Більшість з них локалізована на плазматичній мембрані за виключенням ZIP7-8 і ZIP13, які знаходяться на поверхні внутрішньоклітинних органел. Методи нокаутування генів надали важливу інформацію щодо біологічної значимості протеїнів сімейства ZIP. ZIP1, ZIP2 і ZIP3 нокаутовані миші характеризуються порушенням ембріогенезом в умовах дефіциту цинку в організмі вагітних тварин [154]. Ембріони ZIP4 нокаутованих мишей гинуть на ранніх стадіях ембріогенезу, тоді як гетерозиготні миші характеризуються фенотипом подібним для такого захворювання як ентеропатичний акродерматит [177]. ZIP13 нокаутовані миші страждають від порушень організації твердої сполучної тканини, включаючи кістки, зуби, шкіру та очі, а в людини втрата ZIP13 призводить до дисплазії хрящової тканини. Миші із втраченим ZIP14 мають порушення структури G-протеїн сполучених рецепторів (GPCR) і характеризуються затримкою росту та порушенням глюконеогенезу [320, 310].

Експортери іонів Zn²⁺. У ссавців відомо десять протеїнів – членів сімейства ZnT. Більшість із них перебувають на мембранах внутрішньоклітинних органел (комплексі Гольджі, ендосомах і ендоплазматичному ретикулумі) і тільки ZnT1 експортер знаходиться на поверхні плазматичної мембрани, що свідчить про його головну роль як регулятора потоку цинку спрямованого із клітини у міжклітинний простір [213]. Порушення структури ZnT генів призводить до утворення різних фенотипів, що дозволяє з'ясувати біологічну функцію окремих членів сімейства. ZnT1 нокаутовані миші гинуть на ранніх стадіях ембріогенезу [342]. Мутації ZnT2 і ZnT4 в мишей є причиною продукції молока з низьким вмістом цинку, а ZnT3 нокаутовані тварини схильні до спонтанних судорог [102, 172]. Миші із втратою ZnT5 характеризуються затримкою росту, остеогенними порушеннями, а також

порушеною продукцією цитокінів тучними клітинами [257, 348]. Поліморфізм гена *ZnT8* пов'язаний з розвитком цукрового діабету II типу в людей, а делеція гена *ZnT8* призводить до порушення секреції інсуліну в мишей [123].

Зміни концентрації цинку у клітині також впливають на експресію та локалізацію транспортерів цинку: збільшення експресії протеїнів сімейства ZIP і зменшення – сімейства ZnT у відповідь на зменшення концентрації цинку в клітині [135, 62, 325]. ZIP6 блокує ЛПС-індуковане зменшення концентрації цинку в клітині, а також дозрівання дендритних клітин миші [324]. Цинк забезпечує захист клітин легеневого епітелію від індукованого TNF- α ушкодження і цей ефект залежить від експресії ZIP8 [80]. Також повідомлялося про те, що в культурі ендотеліальних клітин артерії вівці експресія *ZIP14* залежить від змін внутрішньоклітинного пулу лабільного цинку; потік екзогенного цинку опосередковує захист від ЛПС-індукованого апоптозу й прямо залежить від рівня експресії ZIP14 [48].

1.4.2 Роль іонів Zn^{2+} у регуляції окремих органів та систем організму

Клітини імунної системи. Дефіцит цинку, або навпаки, його надлишковий рівень може бути причиною порушення функції імунної системи [3, 4, 336]. Регуляція вродженого імунітету та функціонування та формування імунокомпетентності лімфоцитів та моноцитів залежить від концентрації цинку. Механізм цього явища, на думку Wellinghausen (1998) можливо полягає у специфічній взаємодії цинку з імунологічно важливими протеїнами сироватки крові, компонентами сигнальної трансдукції, та біологічними мембранами [336].

Дефіцит цинку не просто пошкоджує який-небудь окремий компонент імунної системи, а є причиною комплексних ефектів, які проявляються на різних рівнях, і у реалізації яких беруть участь декілька сотень генів [165]. Короткотермінові ефекти включають регуляцію біологічної активності тимуліну через вміст цинку в плазмі крові, тоді коли довготермінові ефекти можуть призводити до змін у субпопуляціях імунокомпетентних клітин [148].

Що до ролі цинку у реалізації функцій вродженого імунітету важливо відмітити декілька аспектів. Відомо, що найбільш ранніми реакціями неспецифічного імунітету є рекрутмент лейкоцитів з системного кровотоку до інфікованої тканини шляхом хемотаксису, адгезії і діapedезу. Цинк індукує адгезію мієломонаоцитарних клітин до ендотелію, тоді коли хелатування цинку зменшує рекрутмент клітин. Хемотаксис нейтрофілів – етап, якій передують адгезії, зменшується при цинковому дефіциті *in vivo*. *In vitro*, цинк сам по собі викликає хемотактичну активність нейтрофільних гранулоцитів. Однак для нейтрофільних гранулоцитів більш важливим є загальний вплив цинку на проліферацію клітин, так як нейтрофільні гранулоцити продукуються та вивільнюються кістковим мозком у кількостях порядку 60 мільйонів клітин у хвилину. Крім того, головні функції клітин неспецифічного імунітету такі як, активність натуральних кілерів, фагоцитоз макрофагів і нейтрофілів, генерація окислювального вибуху, послаблюються при дефіциті цинку. Нейтрофіли не відповідають продукцією цитокіну на вплив цинку, проте, можливо, цинк впливає на життєздатність цих клітин із коротким періодом існування [98, 174].

Нейрони гіпокампу. Цинк важливий для синтезу коферментів, які приймають участь у синтезі і метаболізмі біогенних амінів. Цинк з везикул пресинаптичних закінчень деяких глутаматергічних нейронів гіпокампа чинить модулюючий вплив на постсинаптичні N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептори. Під час судом або ішемії, цинк вивільняється у надлишкових кількостях з синаптичних закінчень мохових волокон гіпокампу, та надходить до постсинаптичних нейронів крізь канали, проникні для цинку, підвищуючи при цьому внутрішньоклітинний рівень цинку на декілька порядків, і таким чином призводить до загибелі цих нейронів (ексайтотоксичне ушкодження нейронів [312]. Гострий дефіцит цинку порушує деякі функції мозку у піддослідних тварин та людей [149].

B-клітини підшлункової залози. Широко відомим є той факт, що при цукровому діабеті часто спостерігається гіпоцинкемія та гіперцинкурія. Діабет та резистентність до глюкози достовірно більш поширені у людей, раціон харчування яких характеризується низьким вмістом цинку. Проте не можна з повною

впевненістю сказати, що саме діабет та гіперглікемія впливають на метаболізм цинку, або навпаки, порушення метаболізму цинку впливає на метаболізм вуглеводів. Найбільш правильною здається думка про те, що ці компоненти знаходяться у залежних, конкурентних відносинах та впливають друг на друга [97].

Секреція інсуліну В клітинами відбувається тонічно – на постійному низькому рівні [97]. Глюкоза та інші стимулятори секреції стимулюють вивільнення великої кількості інсуліну із секреторних гранул В-клітин панкреатичних островців, в яких він зберігається спільно із іонами Zn^{2+} . Присутність двох іонів цинку, локалізованих в центрі гексамеру інсуліну та зв'язаних із амінокислотними залишками HisB10 та GluB13 важлива як для нормального процесінгу так і для кристалізації інсуліну [246]. Більш того, цинк який вивільняється разом із інсуліном може відігравати важливу роль у паракринному контролі секреції глюкагону [189], а в умовах *in vitro* навіть приймає активну участь у процесах гибелі В-клітин [343].

Також у ряді робіт досліджувався зв'язок між цинковим статусом та резистентністю до інсуліну. Було встановлено, що щури з дефіцитом цинку резистентні до дії екзогенного інсуліну. Запропоновано декілька можливих механізмів впливу цинку на дію інсуліну, включаючи роль цинку в модулюванні активності тирозинкінази рецептору інсуліну. Показано, що цинк збільшує фосфорилування протеїнкінази порівняно з іншими катіонами. У адипоцитах щурів, додавання цинку *in vitro* (100 мкМ) збільшує аутофосфорилування рецептору інсуліну в 2 рази та збільшує інсулінзалежне фосфорилування субстрату-1 інсулінового рецептора в 5 разів [305].

Клітини простати. Цинк присутній у простаті чоловіків, собак, щурів та багатьох інших тварин у відносно великих концентраціях. Загальний рівень цинку в простаті у 3–10 разів більший ніж у будь яких інших м'яких тканинах організму [112]. Цинк переважно сконцентрований у клітинах залозистого епітелію та пов'язаний з білками, такими як металотіонеїн та білки секрету простати [270].

Відносно небагато відомо і про механізми, завдяки яким клітини простати підтримують гомеостаз цинку, хоча існують непрямі свідчення того, що цинк може відігравати важливу роль у простаті [155]. У досить великій кількості робіт

показана залежність між вмістом цинку в клітинах простати та злоякісними новоутвореннями цієї залози [212]. При карциногенезі простати відбувається трансформація клітин, які акумулюють цинк у злоякісні клітини, які цинк практично не акумулюють [328]. У клітинах карциноми передміхурової залози вміст цинку в 5 раз менший у порівнянні з нормальним вмістом цинку в клітинах латеральної частини простати, хоча тут треба зауважити, що при гіперплазії простати вміст цинку в ній зростає майже у 3 рази [164]. Також існує думка, що тривалий прийом великих доз препаратів цинку є фактором, який може збільшувати ризик виникнення карциноми простати. Це явище можна пояснити тим, що синтез одного із білків транспортерів цинку Zip1 у простаті регулюється пролактином та тестостероном і це може бути причиною атипово великого вмісту цинку в клітинах епітелію простати. Синтез Zip1 у клітинах карциноми простати у значній мірі зижнений і це може пояснювати низький вміст цинку в злоякісних клітинах [328].

Клітини Панета базального відділу крипт тонкої кишки. До недавнього часу цинку у секреторних гранулах клітин Панета приділялась незначна увага. Так Н. Naase та W. Maret (2010) у оглядовій роботі «The Regulatory and Signaling Functions of Zinc Ions in Human Cellular Physiology» що до вмісту клітин Панета лише зазначають: «*Paneth cells secrete microbicidal defensin peptides (cryptidins). The secretion of zinc is thought to be an “adjuvant” to this microbicidal function*» [155]. Єщенко Ю.В. (2012) було показано, що у клітинах Панета між змінами вмісту цинку та катіонних білків наявний кореляційний зв'язок, завдяки чому вдалося визначити, що цинк приймає участь в утворенні депо-форми катіонних білків [14].

Висновки

- Епітеліальний бар'єр тонкої та товстої кишки підтримує гомеостаз бактеріальної мікрофлори і є першою лінією захисту від патогенів. Ця функція реалізується завдяки клітинам кишкового епітелію на всіх рівнях його організації: молекулярному, клітинному й тканинному.

- Однією з важливих ланок механізму неспецифічного антибактеріального захисту слизової оболонки тонкої кишки є клітини Панета, характерна особливість яких – наявність значної кількості лабільного цинку в секреторних гранулах, який виконує важливу роль у механізмах секреції й подальшої активації α -дефенсинів.
- Цинк є принципово важливою складовою частиною цілого ряду внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, приймає участь у регуляції апоптозу, забезпечує функціонування й регуляцію активності металоензимів, захищає мембрани епітеліальних клітин від окиснення.
- Порухення кожної з ланок налагодженого та еволюційно консервативного механізму місцевого антибактеріального захисту епітелію слизової оболонки кишки може бути причиною запалення внаслідок порушення мікробного гомеостазу кишкової мікрофлори.

Ґрунтуючись на вказаних вище узагальненнях та власних попередніх спостереженнях нами була сформульована робоча гіпотеза про те, що катіони цинку можуть відігравати суттєву роль у процесах регуляції бар'єрної функції слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки в умовах запальної реакції.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Умови утримання тварин, дози та шляхи введення препаратів

Визначення оптимальної моделі альтерації слизової оболонки тонкої кишки для подальшого дослідження ролі іонів Zn^{2+} у її функціональних змінах за умов запальної реакції. Дослідження моделі запаленні тонкої кишки індукованого інгібітором ЦОГ індометацином було проведено на 42 білих нелінійних щурах, віком 9-12 міс, вагою 263 ± 18 г, яких утримували у стандартних умовах віварію із вільним доступом до їжі та води. Тварини були поділені на 2 групи: контрольну (7 особин) та дослідну (35 особин). Тваринам дослідної групи підшкірно (п/ш) вводили 0,1% розчин індометацина [229] і виводили із дослідження під ефірним наркозом через 1, 2, 3, 5 та 7-м діб після уведення препарату.

Дослідження впливу дисбактеріозу кишкової мікрофлори на стан епітелію дистального відділу тонкої кишки було проведено на 50 нелінійних білих щурах, віком 60-90 діб, вагою 128 – 145 г, яких утримували у стандартних умовах віварію із вільним доступом до їжі та води. Перед початком досліджень тварини були розподілені на контрольну групу (10 особин) та дві дослідні (по 20 особин у кожній). Тварини дослідних груп отримували: антибіотик ампіцилін, у дозі 50 мг/кг із питною водою; антибіотик лінкоміцин, у дозі 150 мг/кг із питною водою. Курс прийому антибіотиків тривав 6 діб. Тварин виводили із дослідження на 12 добу від початку дослідження (на 6-ту добу після останнього прийому антибіотиків) [32].

Дослідження впливу солей токсичних металів на стан епітелію слизової оболонки тонкої кишки та на вміст цинку і катіонних білків у клітинах Панета було проведено на 35 білих нелінійних щурах, віком 9-12 міс, вагою $292 \pm 19,3$ г, яких утримували у стандартних умовах віварію із вільним доступом до їжі та води. Перед початком досліджень тварини були поділені на 5-ть груп, по 7-м особин у кожній: контрольну групу та 4-ри дослідних. Тваринам I групи дворазово з інтервалом 24 години за допомогою зонду інтрагастрально вводили водний розчин

хлориду ртуті (20 мг/кг), а тваринам групи II – водний розчин хлорид кадмію (40 мг/кг) Тварини III групи протягом 14 діб отримували хлорид ртуті у дозі 5 мг/кг, а тварини IV групи – хлорид кадмію, у дозі 10 мг/кг [327]. Щурів виводили із дослідження на наступну добу після останнього прийому солей токсичних металів.

Дослідження функціонального стану клітин Панета та морфологічних показників епітелію клубової кишки при аліментарному дефіциті цинку було проведено на 36 щурах, віком 60-65 діб масою 117-119 г, які були поділені на 3 групи, по 12 особин у кожній. Під час проведення дослідження тварин утримували у поліпропіленових клітках, по 2 особини у кожній. Щури I та II груп отримували напівсинтетичний раціон, вміст цинку у якому дорівнював 60 мг/кг. Доступ до їжі у щурів I групи (контроль) не обмежувався. Для того, щоб виключити вплив енергетичної цінності спожитої їжі в різних групах тварин на результати дослідження тварини II групи отримували лише таку кількість їжі, яку споживали за попередню добу тварини із відповідної пари III групи (попарне годування). Тварини групи III (дефіцит цинку) отримували такий же напівсинтетичний раціон, але вміст цинку в ньому не перевищував 2 мг/кг. До складу раціону входили такі компоненти (за масою): соєвий протеїн, оброблений для видалення цинку 1%-вим розчином етилендитетраміноцітової кислоти (ЕДТА) – 18,8%; крохмаль – 33,6%; цукроза – 33,6; кукурудзяна олія – 10%; целюлоза мікрокрystalічна – 4%. До раціону додавали суміш солей макро- та мікроелементів (CaHPO_4 , CaCO_3 , KCl , Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCO_3 (окрім тварин групи №3), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , KIO_3), та вітамінів (нікотинова кислота, ціанокобаламін, Са-D-пантотенат, тіаміну гідрохлорид, рибофлавін, D-біотин, токоферолу ацетат, ретинолу ацетат, кальциферолу ацетат, D-холіну бітарат) [337]. Тварини усіх трьох груп мали необмежений доступ до дистильованої води. Масу спожитої їжі вимірювали щоденно, масу тіла – через добу. На 30 добу об 8:00 усім тваринам обмежували доступ до їжі, та о 16:00 – виводили із дослідження під ефірним наркозом.

Порівняльний аналіз моделей запалення тонкої кишки було проведено на 56 щурах віком 3-4 міс, масою 240-260 г, яких утримували у стандартних умовах віварію із вільним доступом до їжі та води. Перед початком досліджень тварини

були розподілені на 4 групи (контрольну та 3 дослідні). Щури I дослідної групи отримували із питною водою антибіотик лінкоміцин у дозі 60 мг/кг впродовж 5 діб. Щурам II дослідної групи п/ш вводили 0,1% розчин інгібітору ЦОГ індометацина у дозі 2,5 мг/кг, а щурам III дослідної групи – внутрішньочеревно (в/ч) вводили антагоніст фолієвої кислоти (метотрексат) у дозі 20 мг/кг. Тварин, які отримували лінкоміцин виводили на наступну добу після останнього прийому антибіотика, а тварин, які отримували індометацин та метотрексат – через 2 доби після введення препаратів.

Дослідження ролі іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії інгібітору ЦОГ диклофенаку. Дослідження було проведено на білих нелінійних щурах віком 6-8 міс., масою 180-220 г у кількості 300 особин, яких утримували, при природному й додатковому штучному освітленні з 8:00 до 17:00, температура у приміщенні дорівнювала 22-24 °С. Тварини мали доступ до їжі в період між 9:00 – 17:00, а до води – без обмежень. У якості корму використовували збалансований комбікорм ДО-92 (ДСТУ 4120-2002). Усі маніпуляції із тваринами проводили відповідно до норм і рекомендацій Європейської конвенції по захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1985) [17].

Відповідно до плану дослідження (табл. 2.1) з метою модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} щурам одноразово в/ч вводили іонофор цинку – 10% розчин диетилдитіокарбамату натрію (ДЕДТК) у воді для ін'єкцій у дозі 1000 мг/кг [И.В. Торощев, В.А. Ещенко, 1981]. Для блокування ЦОГ тваринам одноразово п/ш вводили неселективний інгібітор ЦОГ Диклофенак-Дарниця (ДФ) у вигляді 2,5% розчину у дозі 50 мг/кг [С.Р. Atchison et al., 2000]. Для модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ здійснювали одноразове комбіноване введення неселективного інгібітору ЦОГ із різними дозами іонофору: ДФ, 50 мг/кг + ДЕДТК, 400 мг/кг та ДФ, 50 мг/кг + ДЕДТК, 1000 мг/кг. Щурам контрольної групи одноразово внутрішньоочеревинно (в/о) вводили фізіологічний розчин.

Таблиця 2.1

Схема дослідження та кількість використаних тварин на кожному етапі

Мета експериментального впливу Доза препарату	Введення препаратів	Часові інтервали виведення тварин з дослідження, діб			
	0 доба	I доба	III доба	V доба	VII доба
Контроль Фізіологічний розчин	60 тварин →	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ ДЕДТК, 1000 мг/кг	60 тварин →	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин
блокування ЦОГ Діклофенак, 50 мг/кг	60 тварин →	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ на тлі бокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 ДФ, 50 мг/кг +ДЕДТК, 400 мг/кг	60 тварин →	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ на тлі бокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 ДФ, 50 мг/кг +ДЕДТК, 1000мг/кг	60 тварин →	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин	↓ 15 тварин

Усі препарати вводили однократно. Через 24, 72, 120 і 168 годин (на першу, третю, п'яту й сьому добу) з дослідження виводили по 15 щурів з кожної групи. З них 5 особин використовували для оцінки проникності кишкового бар'єра, а 10 – для проведення всіх інших досліджень.

2.2 Морфометричні та мікроморфометричні методи досліджень

Зважування тварин проводили за допомогою електронних ваг з діапазоном зважування 1-1000 г, точність ± 1 г, а визначення маси органів – ваг з діапазоном зважування 0,1-100 г, точність $\pm 0,01$ г. Перед проведенням кожної серії зважувань ваги тарували повіреними гирями масою 50 і 1 грам відповідно. Виміри довжини тонкої кишки через 5-10 хв після вилучення і розміщення його на рівній

горизонтальній поверхні за допомогою лінійки з нержавіючої сталі довжиною 1 метр (ДСТУ 427-75).

Оцінку ступеня виразкових уражень проводили шляхом виміру їх площі на цифрових знімках слизової оболонки (зб. $\times 10$) за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення (NIH ImageJ версії 1.49u) після попереднього калібрування цифрових знімків по еталонному об'єкту відомої довжини. Результати вимірів виражали як загальна площа виразкових уражень на 1 см^2 слизової оболонки кишки [192].

Мікроморфометричні дослідження. Тканину кишки фіксували у формаліні та по стандартній гістологічній методиці заливали в парафінові блоки з яких виготовляли мікротомні зрізи товщиною 6 мкм, які забарвлювали гематоксилін-еозином. За допомогою мікроскопа MICROMED XS-5520 і цифрової фотокамери одержували зображення мікропрепаратів, аналіз яких проводили за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення NIH ImageJ, після попереднього його калібрування по еталонному об'єкт-мікрометру (загальна довжина шкали 1000 мкм, ціна поділу 10 мкм).

Довжину ворсинок вимірювали від апікального відділу до устя крипт, глибину крипт – від устя до базального відділу клітин Панета. Ширину ворсинок вимірювали в середній частині при зб. $\times 100$. Дані показники одержували для 10 ворсинок у не суміжних полях зору. Лейкоцитарну інфільтрацію оцінювали шляхом підрахунку середньої кількості лейкоцитів у тканині кишкового вмісту в 10 несуміжних полях зору при зб. $\times 400$ [1].

2.3 Оцінка швидкості транзиту кишкового вмісту

Для оцінки швидкості транзиту кишкового вмісту щурам інтрагастрально вводили 10% водну суспензію активованого вугілля у 1% розчині желатину в об'ємі 1,5 мл. Через 30 хв тварин виводили із дослідження під ефірним наркозом та виміряли дистанцію, яку пройшло активоване вугілля від пілоричного сфінктеру шлунка до більш дистального відділу тонкої кишки. Отримані

результати виражали як відсоткове співвідношення до загальної довжини кишки [281].

2.4 Оцінка бар'єрної функції кишкового епітелію

Для оцінки бар'єрної функції кишкового епітелію використовували метод, заснований на здатності кишкового епітелію адсорбувати вітальні барвники [207]. У щурів під ефірним наркозом виділяли ізольовану кишкову петлю в яку за допомогою шприца вводили 0,3 мл 2% розчину нігрозину в 0,05 М фосфатному буфері (рН 6,8), підтримували стан анестезії протягом 60 хв., після чого виводили з дослідження. Відрізок кишки вивертали й ретельно промивали в 6 мМ розчині ацетилцистеїну для видалення зі слизом нігрозину, висушували, зважували, і екстрагували барвник за допомогою дистильованої води (3 мл) на водяній бані з температурою 50 °С протягом 15 хв. Отриманий екстракт центрифугували при 3000 об/хв-1 протягом 10 хв., та вимірювали оптичну щільність супернатанту за допомогою спектрофотометра Spekol-211 при $\lambda = 750$ нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см проти холостої проби, у якості якої використовували екстракт незабарвленого відрізка кишки. Одночасно проводили калібровану пробу (0,002% розчин нігрозину). Розрахунки вмісту нігрозину в екстракті кишки знаходили по методу пропорцій. Результат вимірів виражали в мікрограмах екстрагованого барвнику на грам сухої тканини кишки.

2.5 Визначення лабільного цинку та катіонних білків у клітинах Панета

Визначення неферментних катіонних білків. Для визначення катіонних білків у клітинах Панета використовували модифікований метод забарвлення бромфеноловим [33]. Тканину кишки промивали 0,05 М фосфатним буфером (рН 6,8), фіксували 48 годин у 10% розчині нейтрального формаліну і заливали в парафінові блоки з яких виготовляли зрізи товщиною 6 мкм. Зрізи забарвлювали

протягом 10 хв 1% розчином бромфенолового синього в боратному буфері (рН 8,2), промивали, зневоднювали в спирті 30 с, і монтували в бальзам під покривне скло. На препаратах катіонні білки у секреторних гранулах клітин Панета та гранулоцитів мали синій колір.

Цитохімічне визначення цинку в клітинах. Для визначення цинку в органах тканина тонкої кишки фіксували в ацетоні протягом 24 годин, просвітлювали в ксилолі, заливали в парафінові блоки з яких виготовляли зрізи 6 мкм товщиною, депарафінували і забарвлювали 0,2% водно-аміачним розчином дитизону протягом 3 годин [11]. Після забарвлення зрізи промивали дистильованою водою, монтували в гліцерин і аналізували під мікроскопом. На препаратах дитизонат цинку в секреторних гранулах клітин Панета та гранулоцитах мали пурпурово-червоне забарвлення.

Визначення середньої площі площу забарвлених бромфеноловим синім та дитизоном гранул проводили на цифрових зображеннях 20 клітин, отриманих у не суміжних полях зору при зб. $\times 1000$ за допомогою програмного забезпечення NIH ImageJ, попередньо каліброваного по еталонному об'єкт-мікрометру.

2.6 Біохімічні методи досліджень

Визначення концентрації цинку в тканинах органів та сироватці крові.

Визначення концентрації цинку в гомогенатах тканин та сироватці крові проводили з використанням набору Dac-Spectromed (Молдова). Принцип методу полягає в тому, що цинк утворює з 5-Br-PAPS комплекс, інтенсивність забарвлення якого при $\lambda = 550$ нм прямо пропорційна концентрації цинку в пробі [170]. Наважку органа вагою 100 мг озолювали в 0,5 мл гарячої азотної кислоти (чда), нейтралізували концентрованим 25% розчином гідроксиду амонію (чда) до значення рН 6-7. Також готували холосту пробу в яку не додавали зразки тканини або сироватки. У першу пробірку (бланк) вносили 2 мл реагенту, у другу (стандарт) вносили 2 мл реагенту й 100 мкл стандартного розчину цинку (концентрація цинку 30,6 мкмоль/л), у третю – 2 мл реагенту й додавали 100 мкл зразка (сироватки крові або гідролізату тканини),

у четверту 2 мл. реагенту й 100 мкл вмісту холостої проби. Пробірки витримували протягом 5 хв., після чого вимірювали абсорбцію зразка, стандарту і холостої проби проти бланка при $\lambda = 550$ нм за допомогою спектрофотометра Spekol-211.

Концентрацію цинку в зразку розраховували за формулою:

$$C = \frac{D_{зр}}{D_{см}} * C_{см}$$

де:

$D_{зр}$ – оптична щільність зразка; $D_{см}$ – оптична щільність стандарту; $C_{см}$ – концентрація цинку в стандартному розчині, 30,6 мкмоль/л.

Визначення активності мієлопероксидази. Для визначення активності мієлопероксидази (МПО, КФ 1.11.1.7) використовували метод Бояркина, заснований на визначенні швидкості реакції окиснення бензидину в присутності перекису водню і МПО з утворенням синього продукту реакції [24]. Наважку слизової оболонки тонкої кишки масою 200 мг гомогенізували з 0,5 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,0); гомогенат центрифугували 5 хв. при 12000 г. До реакційної пробірки додавали: 0,98 мл 0,2М Na-ацетатного буфера (рН 5,0), 0,5 мл 0,01% розчину солянокислого бензидину, 0,02 мл екстракту, 0,5 мл 0,3% перекису водню, а у контрольну – 1,48 мл 0,2 М Na-ацетатного буфера, 0,5 мл 0,01% розчину солянокислого бензидину та 0,02 мл екстракту. Вимір оптичної щільності проводили при $\lambda = 590$ нм протягом 120 с за допомогою спектрофотометра Spekol-211. Активність МПО (умовних одиниць на 1 грам слизової оболонки тонкої кишки) розраховували за формулою:

$$A = \frac{\Delta D * V * n}{t * l * m}$$

де:

A – активність ферменту; ΔD – зміна оптичної щільності; V – загальний об'єм отриманої витяжки, мл; n – кінцеве розведення витяжки в кюветі; t – час реакції, с; l – довжина оптичного шляху, см; m – маса наважки, г.

Визначення активності супероксиддисмутази. Загальну активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали по здатності ферменту інгібувати фотохімічне відновлення нитросинього тетразолю (НСТ) за Поліською [36]. Наважку слизової оболонки тонкої кишки масою 200 мг гомогенізували в 400 мкл 50 мМ К,Na-Фосфатного буфера (рН 7,8), гомогенат центрифугували протягом 5 хв. при 12000g. До реакційної пробірки додавали: 0,5 мл 0,05% розчину НСТ, 0,9 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, 100 мкл екстракту, 20 мкл 0,24% розчину Na-ЕДТА, 20 мкл 0,025% рибофлавіну, а до контрольної – 0,5 мл 0,05% розчину НСТ, 1 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, 20 мкл 0,24% розчину Na-ЕДТА та 20 мкл 0,025% рибофлавіну. Для кожного зразка підготовляли 2 однакові пробірки з реакційною сумішшю й екстрактом. Також готували контрольні пробірки без ферментативної витяжки – для розрахунків максимального утворення формагану. У ці пробірки замість екстракту вносили 100 мкл К,Na-фосфатного буфера. Реакцію запускали додаванням 20 мкл 0,025% рибофлавіну в усі пробірки, уміст перемішували. Темряві контролі, включаючи пробірки для визначення максимального утворення формагану, поміщали у світлонепроникний бокс. Інші пробірки встановлювали під двома люмінесцентними лампами (по 18 Вт). Реакцію зупиняли через 15 хв. шляхом вимикання світла. Оптичну щільність вимірювали при $\lambda = 560$ нм за допомогою спектрофотометра Spekol-211. За одиницю активності СОД приймали кількість ферменту, здатного інгібувати реакцію відновлення НСТ на 50%. Спочатку обчислювали відповідність отриманої оптичної щільності одиниці активності. Для цього отриману оптичну щільність максимального утворення формагану ділили на два та приймали за 50% пригнічення або 0,5 одиниць. Розрахунки проводили за формулою:

$$\alpha = 1 - \frac{D_{\text{зразка}} * 0.5}{D_{\text{формагану}} / 2}$$

Активність СОД (умовних одиниць активності ферменту на 1 мг протеїну) розраховували за формулою:

$$A = \frac{\alpha * V * n}{C * l}$$

де:

A – активність ферменту; a – відносна одиниця активності; V – об’єм отриманої витяжки, мл; n – кінцеве розведення витяжки в кюветі; l – довжина оптичного шляху, мм; C – кількість протеїну в даній наважці, мг.

Визначення активності каталази. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали за методом Королюка (1988), принцип якого полягає в тому, що в присутності кисню в реакційній суміші утворюється забарвлений продукт окиснення жовтого кольору [22]. Наважку слизової оболонки тонкої кишки масою 200 мг гомогенізували в 400 мкл 50 мМ К, Na-Фосфатного буфера (рН 7,8), гомогенат центрифугували протягом 5 хв при 12 000g. Проби зберігали в холодильнику при 4 °С. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл екстракту до 2 мл 0,03 % розчину перекису водню. У холосту пробу замість екстракту вносили 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв. додаванням 1 мл 4% молібдату амонію. Оптичну щільність продукту реакції виміряли проти контрольної проби, в яку замість перекису водню вносили 2 мл води при $\lambda = 410$ нм за допомогою спектрофотометра Spekol-211. Активність каталази (ммоль/хв/мг протеїну) розраховували за формулою:

$$A = \frac{D_{хол} - D_{зр} * V * n}{\epsilon * C * t * v * l}$$

де:

A – активність каталази; $D_{хол}$ – оптична щільність холостої проби; $D_{зр}$ – оптична щільність зразка; V – загальний об’єм суміші в кюветі; n – розведення вихідного екстракту; ϵ – мілімолярний коефіцієнт екстинкції комплексу H₂O₂ з молібдатом амонію (22,2 мМ⁻¹*см⁻¹); C – концентрація білка в гомогенатах; t – час інкубації, с; v – об’єм внесеної проби, мл; l – довжина оптичного шляху, см.

Визначення концентрації нітритів . Для визначення основних метаболітів нітрогену оксиду був використаний метод визначення нітрит-іона, заснований на здатності первинних ароматичних амінів у присутності азотистої кислоти утворювати інтенсивно забарвлені діазосполуки [21]. Наважку слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки масою 400 мг гомогенізували в 1,6 мл дистильованої води. Проби збовтували при кімнатній температурі

протягом 2 годин, потім центрифугували протягом 5 хв. при 12 000g. У пробірку доливали 1 мл супернатанта й 1 мл 10% розчину реактиву Грися в 10% оцтовій кислоті й через 30 хв. вимірювали оптичну щільність продукту реакції за допомогою спектрофотометра Spekol-211 при $\lambda = 540$ нм проти холостої проби (дистильована вода). Концентрацію нітритів в аналізованих зразках тканини розраховували за формулою:

$$C = \frac{D_{зр}}{D_{см}} * C_{см}$$

де:

$D_{зр}$ – оптична щільність зразка; $D_{см}$ – оптична щільність стандарту; $C_{см}$ – концентрація нітрит-іона в стандартному розчині (50 мкмоль/л).

Оцінка загальної відновлювальної активності. Використовували метод заснований на реакції відновлення калію (III) фериціаниду, який у присутності речовин із відновлювальними властивостями відновлюється до $K_4[Fe_2(CN)_6]$, а його взаємодія з окисненою формою Fe^{2+} призводить до утворення забарвленого з'єднання – берлінської лазури ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) [23]. Наважку слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки масою 500 мг гомогенізували в 2 мл ацетатного буферу (рН 3,69), переносили в пробірки і центрифугували 5 хв. при 12000 g. До реакційної пробірки додавали 500 мкл екстракту (буфера – у контролі), 25 мкл 1% розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, 1,9 мл дистильованої води, 50 мкл 2% розчину $FeCl_3$. Пробірки витримували 5 хв, додавали дистильовану воду і 2% розчин $FeCl_3$, знову витримували 5-7 хв., і виміряли оптичну щільність по відношенню до контрольного розчину (реакційна суміш із буфером замість екстракту) при $\lambda = 680$ нм. Вміст суми непрямих антиоксидантів в екстракті визначали за допомогою каліброваної кривої, побудованої по аскорбіновій кислоті в діапазоні концентрації 100-1000 мг/л.

Далі розраховували суму антиоксидантів в екстракті за формулою:

$$C = \frac{K * V * n}{m * l}$$

де:

C – загальна відновлювальна активність, виражена в еквівалентах аскорбінової кислоти, мкг/г сирової ваги; K – концентрація аскорбінової кислоти, мкг/мл; V – загальний об'єм екстракту, мл; n – розведення екстракту в реакційній суміші; l – довжина оптичного шляху, см; m – маса сирової наважки, г.

2.7 Фізико-хімічні методи досліджень

Визначення гідропероксидів ліпідів методом йодометричного титрування. Для визначення гідропероксидів ліпідів у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки застосовували метод йодометричного титрування з амперметричним визначенням кінцевої точки по Oette, 1963 [256]. Гомогенат слизової оболонки тонкої кишки (200 мг) переносили до пробірки, додавали 5 мл хлороформу та екстрагували ліпіди протягом 5 хв.; 1 мл екстракту переливали у 20 мл пробірку, додавали 150 мг KI і 10 мл. 2% оцтової кислоти в суміші хлороформ : етанол (1 : 3). Пробірку закривали й залишали в темряві на 1 ч. Вільний йод, що утворився, відновлювали надлишком 0,0001 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ під контролем мікроамперметра (UniTEST MM-103, нижня межа визначення сили току 20 мкА) оснащеного двома графітовими електродами діаметром 0,5 мм. При додаванні достатньої кількості тіосульфату відбувалося падіння напруги до невизначуваних величин, а також пропадало забарвлення зразка, обумовленого наявністю елементарного йоду. Надлишок тіосульфату титрували 0.0001 н. розчином KIO_3 . Кінцеву точку титрування визначали по різкому стрибку напруги від нуля до визначених величин. Для усунення впливу слідів можливих окиснювачів використовували «реагент-бланк», який титрували зазначеним вище способом, але без додавання досліджуваного зразка. Для виключення можливого впливу речовин здатних поглинати тіосульфат титрували «тіосульфат-бланк» як описано вище, але за винятком того, що окисненню йоду запобігали додаванням тіосульфату до реакційної суміші безпосередньо після додавання розчину оцтової кислоти в

хлороформ-етаноловій суміші та негайно проводили процедуру зворотного титрування йодатом.

Концентрацію гідропероксидів ліпідів у зразку (нмоль/г сирової маси слизової оболонки тонкої кишки) розраховували за формулою:

$$C = \frac{(V_1 * V_2 - (B_1 + B_2)) * 10^{-3}}{W}$$

де:

V_1 – об'єм 0,0001 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; V_2 – об'єм 0,0001 н. розчину KIO_3 ; B_1 – об'єм (мл) йодату необхідного для титрування «реагент бланка»; B_2 – об'єм (мл) йодату необхідного для титрування «тіосульфат-бланка»; W – вага зразка, г.

Визначення вмісту цинку у кістковій тканині тварин із аліментарним дефіцитом цинку. Стегнові кістки тварин висушували, подрібнювали та озолювали у муфельній пічці при 600-650 С° протягом 8 годин. Зола розчиняли у 6 М хлорводневій кислоті та вимірювали концентрацію цинку за допомогою атомно-адсорбційного спектрофотометра Сатурн ЗП-1 [79].

2.8 Мікробіологічний аналіз пристінного слизу клубової кишки

Для бактеріоскопічного дослідження на ретельно знежирених стерильних предметних скельцях робили мазки відбитки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, як підсушували, фіксували у полум'ї та забарвлювали за Грамом через фільтрувальний папір. Ідентифікацію окремих родин бактерій проводили користуючись відповідними методичними вказівками та визначниками бактерій [43, 72]. Результати дослідження виражали як відсоткове співвідношення окремих родин бактерій, ідентифікованих у мазках-відбитках слизової оболонки тонкої кишки.

Для бактеріологічного аналізу у тварин в асептичних умовах брали відрізок клубової кишки довжиною 5 см, розрізали вздовж і, акуратно, щоб не порушити шар слизу, за допомогою стерильного пінцета видаляли кишковий уміст. Потім стерильним покривним склом зіскрібали слиз з поверхні слизової оболонки кишки,

переносили за допомогою стерильного тампону в транспортне мікробіологічне середовище (AMIES Portagerm) і доставляли в бактеріологічну лабораторію. Зіскрібки висівали на селективні діагностичні середовища: Ендо, Плоскирева, ВСА – для визначення патогенних ентеробактерій, жовчно-сольовий агар і середовище Сабуро – для визначення стафілококів і грибів; середовище Ендо і цитрат Сіммонса для визначення кишкової палички та умовно-патогенних ентеробактерій; 5% кров'яний агар і середовище ЕДДС – для визначення ентерококів; середовище Блаурока – для визначення біфідобактерій і середовище MRS – для визначення лактобацил. Результати бактеріологічного дослідження виражали як десятковий логарифм кількості колонієутворюючих одиниць (log КУО) [45].

2.9 Статистична обробка даних

Статистичну обробку отриманих даних проводили загальноприйнятими методами описивної статистики (розрахунок середнього арифметичного (M), стандартного відхилення (SD) та похибки середнього арифметичного (SE)) з використанням пакету прикладних програм STATISTICA 6.1. Для порівняння відмінностей між групами використовували непараметричні критерії Колмогорова-Смирнова та критерій Мана-Уїтні, які були обрані з урахуванням можливості їх використання для «малих» ($n < 30$) вибірок. Статистично значимими вважали відмінності між групами при $p < 0,05$ [37].

РОЗДІЛ 3

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОЇ МОДЕЛІ АЛЬТЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ

Наявність великої кількості способів альтерації слизової оболонки тонкої кишки потребувала попереднього проведення досліджень для визначення найбільш оптимальної моделі для подальшого дослідження фізіологічної ролі іонів Zn^{2+} у запаленні тонкої кишки. У цілому даний час для дослідження ЗХК запропоновано як мінімум 66-ть різноманітних моделей із використанням тварин [236]. Ці моделі поділяють на 5-ть різних категорій: 1) антиген-індуковане запалення кишки та запалення кишки, індуковане мікроорганізмами; 2) інші індуковані форми запалення кишки (хімічне, імунологічне, фізичне); 3) генетичні моделі (трансгенні та нокаутовані моделі); 4) моделі перенесення клітин адаптивної імунної системи; 5) моделі спонтанного запалення кишки. Але незважаючи на велику загальну кількість моделей ЗХК серед них не існує «ідеальної», яка б у повній мірі враховувала усі важливі механізми виникнення та розвитку даного стану. Тому при застосуванні у конкретному дослідженні необхідно враховувати численні аспекти кожної з моделей, для того, щоб обрати найбільш оптимальну з них [61].

3.1 Функціональний стан клітин Панета при альтерації слизової оболонки тонкої кишки інгібітором циклооксигенази

Перше пілотне дослідження мало за мету визначити, чи наявні будь-які зміни вмісту у секреторних гранулах клітин Панета цинку та флоксифільного секреторного матеріалу за умов запальної реакції у тонкій кишці. Оскільки однією з поширених методик моделювання стану запалення слизової оболонки даного органу є застосування неселективних інгібіторів ЦОГ [229], для проведення дослідження був обраний індометацин (1-(4-хлоробензоїл)-5-тетоксі-2-метил-3-індолеоцтова

кислота), оскільки цей препарат характеризується найбільшою ентеротоксичністю порівняно з іншими НПВП [229, 124].

У результаті дослідження були отримані результати про те, що ознаки запальної відповіді у тонкій кишці спостерігались у тварин у I-V добу після введення індометацина. Аналіз гістологічних препаратів показав, що у зазначений часовий інтервал у тварин спостерігалася лейкоцитарна інфільтрація тканини кишки (рис. 3.1), особливо виражена у перші три доби після введення індометацина.

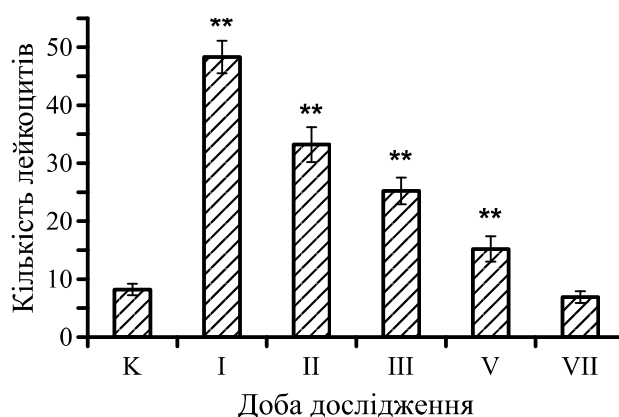


Рис. 3.1. Кількість лейкоцитів у полі зору (зб. x400) у тканині тонкої кишки на I-VII добу після введення індометацина ($M \pm SE$; $n = 7$ у кожній групі). **Примітка:** тут та далі * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем

Так, кількість лейкоцитів у полі зору тварин на I добу перевищувала показники контрольних щурів у 5,9 рази ($p < 0,01$), на II добу у 4 рази ($p < 0,01$), на III добу – у 3,1 рази ($p < 0,01$) і на V-VII добу – у 1,8 рази ($p < 0,01$) і 26 % відповідно. Таким чином, максимальний ступінь запальної відповіді у тканині тонкої кишки спостерігався через 24 години після уведення блокатора ЦОГ індометацина. З II по V добу відбувалось поступове зменшення запалення у тканині тонкої кишки. На VII добу кількість лейкоцитів у щурів, які отримували блокатор ЦОГ вже статистично не відрізнялась від значень контрольних тварин. У цілому подібна динаміка розвитку запальної відповіді при уведенні блокаторів ЦОГ у надтерапевтичних дозах підтверджується рядом досліджень [229, 124].

Результати досліджень вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета щурів при запаленні тонкої кишки і контрольних тварин (рис. 3.2), дозволили встановити, що при розвитку гострого запального процесу у тонкій кишці за умов блокування ЦОГ (індометацина), відбувається суттєва активація секреторної функції клітин Панета, про що свідчить зменшення інтенсивності цитохімічної реакції дитизону на іони Zn^{2+} та флоксину на секреторний матеріал в гранулах цих клітин.

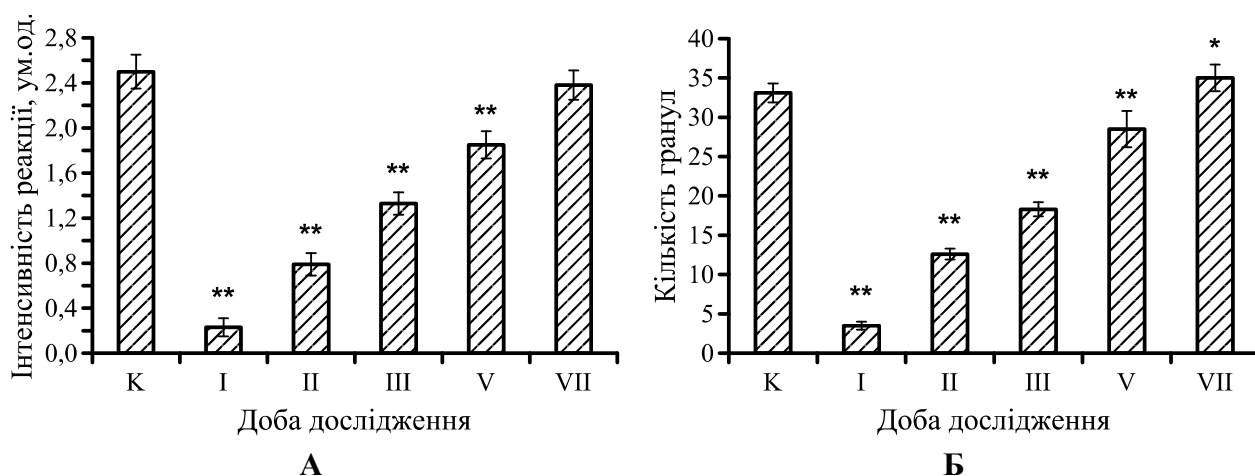


Рис. 3.2. Інтенсивність цитохімічної реакції дитизону на цинк (А) та кількість секреторних гранул забарвлених флоксином (Б) у клітинах Панета щурів на I-VII добу після введення індометацина ($M \pm SE$; $n = 7$ у кожній групі)

на I добу інтенсивність цитохімічної реакції дитизону зменшувалась на 91% ($p < 0,01$), а кількість гранул забарвлених флоксином була менша за показники контрольних тварин на 89% ($p < 0,01$). У подальший термін дослідження спостерігалось поступове відновлення вмісту цинку та секреторного матеріалу в клітинах. Так, на II добу інтенсивність цитохімічної реакції дитизону була менша за контрольні показники на 68% ($p < 0,01$), а кількість гранул забарвлених флоксином – на 31% ($p < 0,01$); на III-V добу ці показники були відповідно менші на 47% і 26% ($p < 0,01$) для інтенсивності цитохімічної реакції дитизону, та на 47% і 14% ($p < 0,01$) для кількості гранул забарвлених флоксином. На VII добу вміст цинку в клітинах Панета був меншим лише на 5% ($p < 0,01$), а кількість гранул секреторного матеріалу навіть більша за показники контрольних тварин на 6% ($p < 0,05$).

Отже, нами вперше було показано, що при запаленні тонкої кишки у щурів простежуються ознаки залежності між інтенсивністю запальної відповіді у слизовій оболонці тонкої кишки та секреторною активністю клітин Панета.

Цей факт може бути пояснений тим, що по-перше, активна секреція клітинами Панета антимікробних поліпептидів у ділянках запалення та некрозу тканини кишки запобігає інфікуванню патогенними мікроорганізмами, а також сприяє міграції лейкоцитів до ділянок ураження, оскільки АМП клітин Панета мають хемоатрактивні властивості для нейтрофілів [81, 259]. По-друге, секреція клітинами Панета секреторної фосфоліпази А2 та TNF- α може впливати як на процеси індукції запалення, так і подальшої регенерації тканини кишки [326].

Також нами були отримані свідчення того, що при запальній відповіді у тонкій кишці разом із секреторним матеріалом відбувається секреція іонів Zn^{2+} . Фізіологічному значенню процесу одночасної секреції АМП та іонів Zn^{2+} на даний момент приділяється незначна увага, оскільки вважається що він слугує переважно як «ад'ювант» до секреції АМП [95]. Однак враховуючи те, що даний мікроелемент має дуже важливе значення для регуляції запальної відповіді ми схильні вважати, що збільшення рівня секреції цинку за умов запальної реакції може відігравати пряму або опосередковану роль у розвитку запальної відповіді у тонкій кишці.

Подальше вивчення обраної теми дослідження потребувало від нас усунення деяких виявлених методологічних недосконалостей. По-перше, використання флоксину хоча й дозволяє визначити загальний вміст протеїнів у секреторних гранулах клітин Панета («секреторний матеріал»), але не є загальноприйнятим методом визначення антимікробних катіонних білків; дійсно флоксифільні гранули у цитоплазмі виявляється у тому числі й у В-клітинах підшлункової залози та нервових клітинах ядер гіпоталамуса [147]. Однак АМП у зазначених клітинах відсутні. По-друге, напівкількісна оцінка вмісту цинку за бальною шкалою та катіонних білків – за підрахунком кількості гранул, не можуть бути у достатній мірі об'єктивними. Тому для подальших досліджень нами була розроблена модифікація метода визначення катіонних білків у гранулоцитах крові за Шубичем, адаптована для гістологічних зрізів тканин, а визначення забарвлених продуктів цитохімічних

реакцій у гранулах проводилось за їх площею із використанням методів комп'ютерної мікроморфометрії [338].

3.2 Вплив хлоридів ртуті та кадмію на морфологічні показники слизової оболонки тонкої кишки та вміст у секреторних гранулах клітин Панета цинку та катіонних білків

Відомо, що молекула дефенсину у відновленій формі проявляє виражені властивості хелатоутворювача, оскільки має 32 залишків цистеїну, що дозволяє утворювати координаційні зв'язки із одним еквівалентом Zn^{2+} або Cd^{2+} [284]. Тому нами було вирішено дослідити вплив на стан клітин Панета та епітелію слизової оболонки тонкої кишки більш реакційно активних, ніж Zn^{2+} катіонів – Hg^{2+} та Cd^{2+} . Дані хімічні елементи були обрані виходячи з наступних міркувань: катіони Hg^{2+} мають велику спорідненість до сірки у амінокислотних ланцюгах білків; кадмій за фізико-хімічними властивостями дуже подібний до цинку, але на відміну від нього значно більш активний у біологічному середовищі [196]. Також варто згадати, що клітини Панета приймають участь у екскреції важких металів, тому можна очікувати, що катіони Hg^{2+} та Cd^{2+} під час міграції в організмі повинні обов'язково потрапляти у секреторні гранули цих клітин для подальшого їх виведення з організму [221]. Таким чином, виходячи з цих положень основне завдання дослідження полягало у визначенні того, чи будуть катіони Hg^{2+} та Cd^{2+} впливати на стан клітин Панета та інших клітин кишкового епітелію?

У результаті дослідження вмісту катіонних білків та іонів Zn^{2+} у клітинах Панета щурів при одноразовому пероральному уведенні хлориду ртуті у дозі 20 мг/кг та хлориду кадмію у дозі 40 мг/кг (табл. 3.1) було встановлено, що у тварин, які отримували хлорид ртуті, інтенсивність цитохімічної реакції дитизону на цинк зменшилась на 62% ($p < 0,01$), а реакції бромфенолового синього на катіонні білки зменшилась на 57% ($p < 0,01$). При введенні хлориду кадмію інтенсивність забарвлення секреторних гранул дитизоном знизилась на 54% ($p < 0,01$), а бромфеноловим синім на – 57% ($p < 0,01$) відповідно.

Таблиця 3.1

Інтенсивність забарвлення секреторних гранул клітин Панета щурів дитизоном та бромфеноловим синім при пероральному уведенні хлоридів ртуті та кадмію ($M \pm SD$; $n = 7$ у кожній групі)

Група тварин	Забарвлення дитизоном, ум. од.	Забарвлення бромфеноловим синім, ум. од.
Контроль	$2,8 \pm 0,24$	$2,2 \pm 0,12$
Група I ($HgCl_2$ — 20 мг/кг)	$1,0 \pm 0,21$ **	$0,9 \pm 0,15$ **
Група 2 ($CdCl_2$ — 40 мг/кг)	$1,2 \pm 0,11$ **	$0,9 \pm 0,11$ **
Група I ($HgCl_2$ — 5 мг/кг)	$1,4 \pm 0,17$ **	$1,2 \pm 0,12$ **
Група 2 ($CdCl_2$ — 25 мг/кг)	$1,6 \pm 0,16$ **	$1,5 \pm 0,13$ **

При хронічному введенні хлоридів зазначених металів у щурів також відбувалося значне зниження вмісту іонів Zn^{2+} (рис 3.3, А1-А2) і катіонних білків у секреторних гранулах клітин Панета (рис 3.3, Б1-Б2). Так, за дії хлориду ртуті інтенсивність цитохімічної реакції дитизону знижувалась на 50% ($p < 0,01$), а бромфенолового синього – на 45% ($p < 0,01$). За дії хлориду кадмію інтенсивність обох зазначених цитохімічних реакцій зменшувалась відповідно на 43% ($p < 0,01$) та 32% ($p < 0,01$).

Також проводилася гістоморфологічна оцінка слизової оболонки тонкої кишки та цитоморфологічна оцінка основних типів клітин кишкового епітелію. Одразу зазначимо, що будь-яких суттєвих відмінностей мікроархітектури епітелію слизової оболонки тонкої кишки тварин, які отримували хлориди ртуті та кадмію від контрольних щурів встановлено не було.

У результаті цитоморфологічної оцінки клітин кишкового епітелію вдалося встановити, що у тварин експериментальних груп спостерігалися дегенеративні й некробіотичні зміни в клітинах Панета: каріопікноз, значно більш інтенсивне забарвлення цитоплазми клітин, ніж у тварин контрольної групи, а в деяких клітинах ядра мали нетипову овоїдну форму. У просвіті крипт зрідка зустрічалися десквамвані клітини Панета. При порівнянні кількості келихоподібних клітин у тварин при хронічному отруєнні хлоридами ртуті й кадмію з контрольними

тваринами спостерігалось їхнє збільшення на 20% ($p < 0,05$). Будь яких видимих змін ентероцитів та ентероендокринних клітин у слизовій оболонці клубової кишки у дослідних тварин, нами виявлено не було.

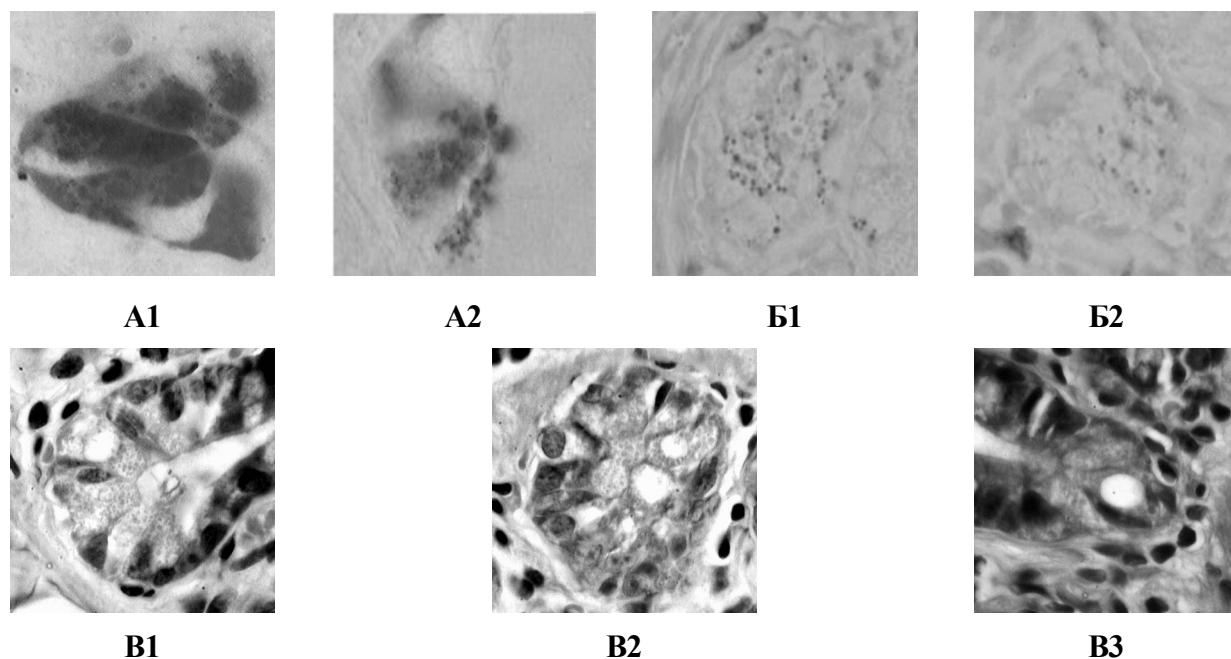


Рис. 3.3. Рис вміст цинку (А) та катіонних білків (Б) у клітинах Панета тварин контрольної групи (1) та при хронічному уведенні хлориду ртуті (2). В1-В3 – фаголізосоми у цитоплазмі клітин Панета тварин, які отримували хлорид ртуті (позначені зірочками).

Отримані нами результати підтверджують наявність певної токсичної дії катіонів ртуті й кадмію у застосованих концентраціях, спрямованої переважно на клітини Панета. Природу спостережуваного явища можна пояснити тим, що надходячи у тонку кишку, катіони Hg^{2+} та Cd^{2+} потрапляють у клітини Панета, де, маючи більшу хімічну спорідненість до атомів сірки у цистеїнових залишках молекули антимікробних катіонних білків (дефенсинів), витісняють його зі складу цих протеїнів, викликаючи при цьому некробіотичні й дегенеративні зміни цих клітин. Цікавим є той факт, що у цитоплазмі багатьох клітин Панета були наявні великі вакуолі (рис. 3.3, В1-В3), які не забарвлювались а ні бромфеноловим синім, а ні дитизоном. Спочатку їх було віднесено до ознак т.з. вакуолярної дистрофії. Але цілком вірогідно, що це аутофаголізосоми, які утворились внаслідок того, що заміна іонів Zn^{2+} на іони Hg^{2+} та Cd^{2+} призводила до неправильного фолдингу протеїнів, які

синтезуються у клітинах Панета. Оскільки помилки у процесі фолдінгу зазвичай є причиною втрати протеїном його основних властивостей, тому такі молекули можуть підлягати шаперон-опосередкованій аутофагії [77].

На нашу думку викладені вище результати показали, що іони Zn^{2+} можуть бути важливим компонентом секреторних гранул клітин Панета і мати функціональне значення. Дійсно, у роботі Ю.В. Ещенко (2012) на основі морфологічного співставлення та кореляційного аналізу було показано, що іони Zn^{2+} у секреторних гранулах утворюють комплекси із катіонним білками [14]. Проте, хоча використання даного підходу надало нам деякі підтвердження щодо можливого функціонального значення іонів Zn^{2+} у секреторних гранулах клітин Панета, подальше його використання у дослідженнях біологічної ролі іонів зазначеного МЕ на нашу думку було недоречним, оскільки як кадмій так і ртуть є токсичними металами, які здатні впливати на усі органи та системи ссавців, а не тільки на слизову оболонку тонкої кишки.

3.3 Морфологічні показники епітелію клубової кишки та функціональний стан клітин Панета щурів з аліментарним дефіцитом цинку

Оскільки наше поперечне дослідження показало, що йони Hg^{2+} та Cd^{2+} цілеспрямовано впливають на клітини Панета, нами було проведено дослідження, мета якого полягала у визначенні того, яким чином буде впливати дефіцит цинку в організмі тварин на стан епітелію тонкої кишки в цілому та на вміст катіонних білків та іонів Zn^{2+} в клітинах Панета зокрема. Для відтворення цинкдефіцитного стану нами була обрана аліментарна (харчова) модель, яка полягала майже у повному обмеженні вмісту цинку в раціоні щурів.

Оскільки концентрація іонів Zn^{2+} у плазмі крові не може бути достовірним показником дефіциту цинку в організмі, так як у великій мірі залежить від перерозподілу іонів даного МЕ між його депо в організмі (кістковою тканиною, паренхімою печінки та плазмою крові) нами визначалась концентрація цинку у стегновій кістці, оскільки резорбція іонів Zn^{2+} з кісткової тканини є найбільш

точним показником тяжкого дефіциту даного МЕ в організмі [196].

Отримані результати дослідження показали, що тварин, які отримували раціон із низьким вмістом цинку, з II доби від початку дослідження спостерігали втрату апетиту та, відповідно, зменшення темпів росту. Водночас у тварин цієї групи впродовж терміну дослідження спостерігали й інші симптоми дефіциту цинку – зниження рухової активності та діарею. Темп росту у тварин з групи попарного годування збільшувався порівняно з тваринами із дефіцитом цинку, але все ж був значно меншим, ніж у тварин контрольної групи. Результати про загальний приріст маси, споживання їжі та цинковий статус для всіх трьох груп тварин зведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Приріст маси тіла, маса спожитої їжі та цинковий статус щурів із аліментарним дефіцитом цинку ($M \pm SD$; $n = 12$ у кожній групі)

Група тварин	Приріст маси тіла, г	Маса спожитої за 30 днів їжі, г/щура	Zn у стегновій кістці (мкг/г) сухої маси
Контроль	134,9±5,71	567±6,7	251,4±8,65
Попарне годування	89,4±4,27 *	296±4,1 **	237,5±7,75 **
Дефіцит цинку	43,8±3,73 ***	279±5,8 **	86,6 3,42 ***

На 30 добу дослідження приріст маси тіла щурів з групи попарного годування був на 33,7% ($p < 0,05$) нижчий, ніж у тварин контрольної групи, яким доступ до їжі не обмежували. У тварин із дефіцитом цинку приріст маси тіла був ще менший і відрізнявся на 67,5% ($p < 0,001$) від контрольної групи та на 51,0% ($p < 0,01$) – від групи із обмеженим доступом до їжі (попарно годівані тварини). Маса спожитої їжі у цинк дефіцитних і попарно годіваних тварин відрізнялася майже вдвічі від цього показника тварин контрольної групи. Цинковий статус у тварин групи попарного годування був нижчим на 5,5% ($p < 0,01$) за показники вмісту цього МЕ у кістковій тканині контрольних тварин. У тварин із цинковим дефіцитом був виявлений більш виражений аліментарний дефіцит даного МЕ, оскільки його вміст у кістковій тканині був знижений на 65,5% ($p < 0,001$) порівняно із контрольною групою.

За результатами морфометричного дослідження тканини клубової кишки щурів (табл. 3.3) було встановлено, що у тварин контрольної групи та у тварин з групи попарного годування не спостерігалось статистично значущих відмінностей між усіма досліджуваними показниками ($p > 0,05$).

У тварин із аліментарним дефіцитом цинку було виявлено зменшення як висоти кишкових ворсинок (на 19,8% порівняно з контролем, $p < 0,001$) так і їх ширини (на 24,2% порівняно з контролем, $p < 0,001$). Водночас у тварин цієї групи достовірно збільшувалась щільність кишкових ворсинок (на 48,2% порівняно з контролем, $p < 0,001$).

Таблиця 3.3

Морфометричні показники епітелію клубової кишки щурів
($M \pm SD$; $n = 12$ у кожній групі)

Група тварин	Висота ворсинок, мкм	Ширина ворсинок, мкм	Щільність ворсинок, кількість/мм ²
Контроль	279,7±6,27	49,6±1,92	21,8±4,31
Попарне годування	275,1±6,35	48,4±1,39	22,1±2,45
Дефіцит цинку	224,3±5,07 ***	37,6±2,31 ***	32,3±2,19 ***

У результаті дослідження функціонального стану клітин Панета, який оцінювали за змінами вмісту катіонних білків та цинку (табл. 3.4), ми змогли встановити, що у щурів з аліментарним дефіцитом цинку відбувається значне їх зниження.

Таблиця 3.4

Площа секреторних гранул клітин Панета щурів при забарвленні бромфеноловим синім та дитизоном, мкм² ($M \pm SD$; $n = 12$ у кожній групі)

Група тварин	Площа секреторних гранул клітин, мкм ²	
	забарвлення бромфеноловим синім	забарвлення дитизоном
Контроль	78,1±4,63	99,8±5,64
Попарне годування	83,0±4,29 *	104,5±4,95 *
Дефіцит цинку	25,3±3,72 ***	39,5± 3,99 ***

У тварин з групи попарного годування площа секреторних гранул забарвлених бромфеноловим синім була менша лише на 6,3% ($p < 0,05$), а дитизоном – на 4,7% ($p < 0,05$) менша ніж у контрольних тварин. У тварин із аліментарним дефіцитом цинку, порівняно з показниками тварин контрольної групи вміст катіонних білків знижувався на 67,6% ($p < 0,001$), а цинку – на 60,4% ($p < 0,001$). Деяке збільшення вмісту катіонних білків та цинку у попарно годуваних тварин можна пояснити таким чином: відомо, що введення інсуліну призводить до підсилення секреції клітин Панета, відповідно обмежений прийом їжі може зменшувати секрецію інсуліну В-клітинами підшлункової залози, що зумовлює накопичення як катіонних білків так і цинку в секреторних гранулах клітин Панета [292].

Широко відомо, що затримка росту та діарея є характерними симптомами дефіциту цинку як у людей, так і у тварин, але дослідженню значення цинку для нормального функціонування шлунково-кишкового тракту зазвичай не приділяють належної уваги. У нашому дослідженні ми зробили спробу оцінити вплив дефіциту цинку на функціональний стан клітин Панета, невід'ємним компонентом яких є саме цей мікроелемент. У результаті нашого дослідження було виявлено, що, по-перше, дефіцит цинку може негативно впливати на антимікробну функцію клітин Панета, яка забезпечується завдяки дефенсінам, які мають пряму антимікробну дію і впливають на активність клітин імунної системи завдяки тому, що мають хемоатрактивні властивості для нейтрофілів і моноцитів [160, 249]. По-друге, морфологічні зміни, які були виявлені в нашому дослідженні, можуть бути наслідком порушеної клітинної проліферації, оскільки абсорбтивна здатність ентероцитів ссавців розвивається прогресивно, в міру того, як вони дозрівають та підіймаються вздовж кишкової ворсинки [73]. Уповільнення диференціювання та міграції клітин може потребувати більшого часу для розвитку абсорбтивних властивостей ентероцитів, із подальшим компенсаторним збільшенням кількості ворсинок на одиницю площі, що ми й спостерігали в нашому дослідженні. Відомо що металоферменти, які містять цинк, відіграють важливу роль у процесах проліферації, тому можна очікувати змін у темпах росту та дозрівання клітин при

дефіциті цього мікроелементу в організмі. Але оскільки в клітинах Панета відбувається експресія гена епідермального фактору росту, то це явище можна пояснити й по-іншому: припускаємо, що дефіцит цинку є причиною порушення нормального функціонування клітин Панета та призводить до уповільнення експресії гену епідермального фактору росту, це впливає на проліферативну здатність стовбурових клітин кишкового епітелію. Цілком правомірною здається гіпотеза про те, що збільшується рівень секреції катіонних білків клітинами Панета; це відбувається під впливом низки несприятливих факторів, які можуть негативним чином впливати на кишковий епітелій, спричиняючи його пошкодження; тому потрібна більш активна диференціація стовбурових клітин, яка стимулюється епідермальним фактором росту, який секретується разом із катіонними білками. Але, звісно, це припущення потребує подальшого поглибленого дослідження.

Підсумовуючи отримані результати, зазначимо що на даному етапі досліджень ми не тільки підтвердили загальновідомі факти про негативний вплив дефіциту цинку на ШКТ, а й отримали свідчення того, що однією з причин діареї за умов аліментарного дефіциту цинку може бути порушення функціонування клітин Панета.

3.4 Морфометричні показники кишкового епітелію та функціональний стан клітин Панета щурів при синдромі надлишкового бактеріального росту в тонкій кишці

Оскільки одним з головних механізмів активації секреторної функції клітин Панета є стимуляція TLR рецепторів клітин слизової оболонки тонкої кишки нами було проведено дослідження, мета якого полягала у визначенні впливу змін складу кишкової мікрофлори на морфологічні показники епітелію слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки та рівень секреції цинку та катіонних білків клітинами Панета за умов початково інтактного епітеліального бар'єру. Для реалізації цієї мети ми використали три моделі індукування дисбіотичних змін у кишці із застосуванням терапевтичних доз препаратів, які не мають будь-якої

ентеротоксичної дії (5% розчин цукрози, яку тварини отримували з питною водою протягом 4-ти діб та антибіотики ампіцилін та лінкоміцин, які тварини також отримували з питною водою, впродовж 6-ти діб. Тварин виводили із дослідження на наступну добу після останнього прийому розчину цукрози та через 5-ть діб після останнього прийому антибактеріальних препаратів.

У результаті бактеріоскопічного аналізу мазків-відбитків пристінного слизового шару клубової кишки щурів (табл. 3.5) контрольної та дослідних груп нам вдалося виявити суттєві зміни складу мікрофлори.

Таблиця 3.5

Склад пристінкової мікрофлори клубової кишки щурів із дисбактеріозом за результатами бактеріоскопічного дослідження ($M \pm SD$)

Група тварин	n	Відсоткове співвідношення бактерій у мазках слизового шару клубової кишки					
		<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Clostridiaceae</i>
Контроль	10	55,8±6,94	5,9±1,85	11,0±2,87	27,3±3,65	–	–
Ампіцилін, 50 мг/кг	20	56,4±4,49	6,1±1,85	13,1±3,81	24,5±3,24	–	–
Лінкоміцин, 150 мг/кг	20	20,8±3,13 **	2,5±0,70 **	28,4±2,19 **	29,0±3,31	18,7±3,72	0,7±0,58
Ампіцилін, 50 мг/кг	20	19,8±2,44 **	2,3±0,87 **	25,8±2,49 **	27,1±2,67 **	17,8±4,69	7,4±1,74

Було встановлено, що у складі пристінної кишкової мікрофлори контрольних щурів наявні лише грам-позитивні бактерії, з яких найбільш широко представлені представники родин *Lactobacillaceae* (55,8%) та *Streptococcaceae* (27,3%). Значно менше поширені *Micrococcaceae* (11,0%) та *Bifidobaeteriaceae* (5,9%).

У тварин, які отримували 5% розчин цукрози нами не було виявлено статистично значущих змін у складі мікробіоценозу пристінного слизу клубової кишки, тому щури даної групи були виключені із подальшого дослідження.

У щурів, які отримували ампіцилін, відзначалися зміни складу пристінної мікрофлори. Так, кількість бактерій родини *Lactobacillaceae* зменшувалась на 62,7% ($p < 0,01$), а *Bifidobaeteriaceae* – на 57,6% ($p < 0,01$). Кількість бактерій родини *Micrococcaceae* навпаки, збільшувалась майже в півтора рази ($p < 0,01$),

кількість бактерій родини *Streptococcaceae* суттєво не відрізнялась від показників контрольної групи. Також у мазках-відбитках тварин цієї групи були виявлені типові представники фекальної мікрофлори – бактерії родин *Enterobacteriaceae* (17,6%) та *Clostridiaceae* (0,7%). У мазках виявлялися десквамовані епітеліальні клітини, як поодинокі, так і цілими групами, були наявні лейкоцити у кількості $1,8 \pm 0,34$ клітин у полі зору.

У щурів, які отримували лінкоміцин, відмічалися подібні зміни мікробіоценозу пристінного слизового шару клубової кишки, лише з тим виключенням, що бактерії родини *Clostridiaceae* зустрічалися в мазках значно частіше. У мазках також виявлялися десквамовані епітеліальні клітини, були наявні нейтрофільні лейкоцити в кількості $2,2 \pm 0,58$ клітин у полі зору. Оскільки трансепітеліальна міграція нейтрофілів є типовою ознакою запалення [262], тому факт наявності лейкоцитів у відбитках слизового шару в нашому дослідженні може свідчити про наявність запальної відповіді, вірогідно викликаною впливом фекальної мікрофлори – бактерій родин *Enterobacteriaceae* та *Clostridiaceae*, які були виявлені в слизовому шарі кишки тварин, які отримували антибіотики.

Спираючись на отримані дані, можна констатувати наявність змін у мікробіоценозі клубової кишки щурів які отримували ампіцилінта лінкоміцин: зменшення представників симбіонтної флори (бактерії родин *Lactobacillaceae* та *Bifidobaeteriaeeae*), збільшення комменсалів (родина *Micrococcaceae*), та поява типових представників фекальної флори (*Enterobaeteriaeeae* та *Clostridiaceae*). Потрапляння фекальної флори до клубової кишки у тварин цих груп можна пояснити функціональною недостатністю ілеоцекального клапану, оскільки в тварин, які отримували антибіотики, було виявлено збільшення об'єму сліпої кишки до $7,6 \pm 1,8$ мл (що майже на 72% більше ніж у контрольних тварин), яке було зумовлене накопиченням газів у кишці, підвищений тиск яких міг призвести до формування цекоілеального рефлюксу [29].

Наступний етап роботи полягав у визначенні морфологічних змін слизової оболонки тонкої кишки за умов дизбактеріозу. Зазначимо, що ми врахували те, що

деякі антибактеріальні препарати можуть чинити пряму токсичну дію на слизову оболонку, тому нами були обрані нетоксичні антибактеріальні препарати (ампіцилін та лінкоміцин), які не мають фармакологічних мішеней у еукаріотичних клітинах. Окрім цього, за результатами токсикологічних досліджень із тривалим застосуванням вищевказаних препаратів у дозах, які значно перевищують терапевтичні, а ні ампіцилін ані лінкоміцин не виявляють будь-яких ентеротоксичних ефектів [129].

За результатами гістоморфологічної оцінки зрізів клубової кишки (рис. 3.4) у тварин із дисбактеріозом на VI добу після останнього прийому антибіотиків візуально виявлялися деформовані кишкові ворсини булаво- та конусоподібної форми. Була наявна статистично значиме зменшення їх висоти на 10% ($p < 0,01$) у тварин які отримували ампіцилін і на 17% ($p < 0,01$) — у тварин, які отримували лінкоміцин, а також збільшення ширини ворсинок відповідно на 18% ($p < 0,01$) та 26% ($p < 0,01$).

Кількість келихоподібних клітин достовірно збільшувалась. У контрольних тварин середня кількість цих клітин у ворсинці дорівнювала $12,3 \pm 1,72$; у тварин, які отримували ампіцилін — $19,7 \pm 1,97\%$ ($p < 0,01$), та $21,4 \pm 1,84\%$ ($p < 0,01$) – у тварин, які отримували лінкоміцин.

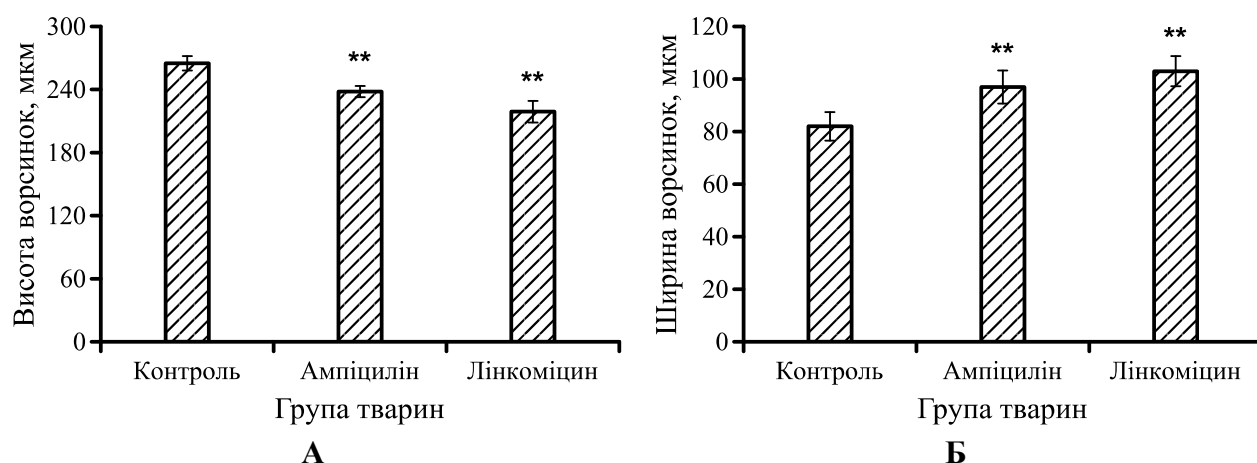


Рис. 3.4. Висота (А) та ширина (Б) кишкових ворсинок у щурів із синдромом надлишкового бактеріального росту у тонкій кишці ($M \pm SE$; Контрольна група $n = 10$; ампіцилін та лінкоміцин, $n = 20$ у кожній групі)

Крипти правильної форми, статистично значущої відмінності їх глибини в тварин контрольної та дослідних груп виявлено не було. Відношення ворсинка/крипта в групах тварин, які отримували антибіотики, змінювалося за рахунок зменшення довжини кишкових ворсинок. У власній пластинці слизової оболонки клубової кишки щурів із СНБР спостерігалися ознаки лейкоцитарної інфільтрації: у тварин контрольної групи кількість лейкоцитів складала $6,1 \pm 0,97$ клітин у полі зору (зб. $\times 400$), у тварин, які отримували ампіцилін – $13,5 \pm 2,4$ ($p < 0,01$) клітин у полі зору, а у тварин, які отримували лінкоміцин – $15,9 \pm 3,9$ ($p < 0,01$) клітин відповідно.

Таким чином, отримані результати вказують на наявність ознак запалення слизової оболонки клубової кишки в щурів із дисбактеріозом, який виник внаслідок прийому ампіциліну та лінкоміцина.

На фоні розглянутих вище змін бактеріальної мікрофлори та ознак запалення слизової оболонки клубової кишки нами спостерігалось зниження вмісту катіонних білків та цинку в клітинах Панета щурів із дисбактеріозом (табл. 3.6). У тварин дослідної групи №1 (5% розчин цукрози) не спостерігалось статистично значущих змін вмісту катіонних білків та цинку в секреторних гранулах клітин Панета.

Таблиця 3.6

Площа забарвлених бромфеноловим синім та дитизоном гранул клітин Панета щурів із синдромом надлишкового бактеріального росту у тонкій кишці, μm^2 ($M \pm SD$)

Група тварин	n	Площа секреторних гранул, μm^2	
		Дитизон	Бромфеноловий синій
Контроль	10	$88,0 \pm 6,34$	$71,4 \pm 7,47$
Ампіцилін, 50 мг/кг	20	$67,7 \pm 4,25$ **	$58,2 \pm 3,71$ **
Лінкоміцин, 150 мг/кг	20	$61,2 \pm 3,98$ **	$54,7 \pm 4,59$ **

У тварин, які отримували ампіцилін та лінкоміцин, порівняно з контролем відбувалося зниження вмісту в клітинах Панета як цинку (відповідно на 23,1%

та 30,5%, $p < 0,01$), так і катіонних білків (на 18,5% та 23,4%, $p < 0,01$), що свідчить про активацію секреторної функції зазначених клітин, що вірогідно обумовлено стимуляцією TLR рецепторів патоген-асоційованими молекулярними патернами бактерій родин *Enterobacteriaceae* та *Clostridiaceae*.

З отриманих результатів можна зробити висновок про те, що навіть за дії експериментальних факторів, які прямо не ушкоджують слизову оболонку кишки, розвивається її запальна відповідь. Це пояснюється тим, що не тільки генетична схильність до запалення або порушення місцевого антибактеріального захисту слизової оболонки тонкої кишки, а й зміни типового складу автохтонної мікрофлори кишки можуть бути тригером запальної відповіді у кишці. Так за даними Swidsinski (2002) у складі пристінної мікрофлори слизової оболонки при запальній хворобі кишки у багато разів підвищується кількість анаеробних *Bacteroides* і аеробних *Enterobacteriaceae* [242]. у пацієнтів з хворобою Крона при термінальному ілеїті збільшується кількість прикріпленої до слизової оболонки кишкової палички та ентерококу [272, 96]. Ці дані літератури, а також отримані нами результати вказують на те, що бактерії коменсали кишкової мікрофлори можуть бути причиною запалення, навіть при початково неушкодженому ЕБК.

Отримані попередні результати дозволили встановити, що за умов ушкодження слизової оболонки тонкої кишки відбувається збільшення рівня секреції іонів Zn^{2+} та катіонних білків клітинами Панета, що пов'язано із змінами складу кишкової мікрофлори. Дефіцит цинку в організмі призводить до порушення діяльності ШКТ у щурів, яке проявляється діареєю, і також супроводжується зниженням вмісту у клітинах Панета цинку та катіонних білків. Оскільки між іонами Zn^{2+} та анимікробними катіонним білками у гранулах цих клітин Ю.В. Єщенко (2012) був продемонстрований функціональний зв'язок із підвищенням рівня секреції катіонних білків відбувається і збільшення секреції іонів Zn^{2+} . Тому на даному етапі дослідження виникає питання про те, як впливає процес, наслідком якого є втрата есенціального мікроелемента (цинку) під час запалення, якщо відомо, що саме цей мікроелемент відіграє важливе значення у регуляції запальної відповіді?

3.5 Функціональний стан клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета щурів при введенні антибіотика, інгібітору ЦОГ та цитостатичного препарату

Оскільки попередні дослідження проводились нами у різний час, різними методами та на різних вибірках тварин, тому останній етап визначення оптимальної моделі альтерації слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки для подальшого дослідження ролі іонів Zn^{2+} у її функціональних змінах за умов запальної реакції полягав у порівнянні 3-х моделей ушкодження епітелію тонкої кишки, які на нашу думку найбільшою мірою могли б дозволити нам досягнути основної мети дослідження. У якості зазначених моделей були обрані: а) модель дисбіозу кишкової мікрофлори із застосуванням лінкоміцина; б) модель ентериту індукованого уведенням неселективного інгібітору ЦОГ індометацина; 3) модель ентериту, викликаного уведенням цитостатичного препарату (антагоніста фолієвої кислоти – метотрексата).

Першим завданням було проведення бактеріологічного аналізу кишкової мікрофлори при уведенні антибіотика лінкоміцина та при запаленні, індукованому введенням інгібітора ЦОГ (індометацина) та антагоніста фолієвої кислоти (метотрексата), яке здійснювалось не тільки з метою встановити особливості змін складу мікрофлори, а за для визначення наявності бактеріальної транслокації з порожнини кишки до клітин кишкового епітелію. Нами було встановлено, що склад мікрофлори у щурів при введенні лінкоміцина, індометацина та метотрексата суттєво відрізняється від контрольних значень (табл. 3.7).

У тварин контрольної групи у кишковому вмісті виявлено бактерії чотирьох родин. Найбільше було лактобацил, найменше ентерококів, а кишкова паличка та біфідобактерії займали проміжне положення. На посівах зіскрібків пристінного слизового шару росту визначалися лактобактерії, кишкова паличка та дріждюподібні гриби роду *Candida*. У посівах гомогенатів тканини були наявні лактобацили та гриби роду *Candida*.

Таблиця 3.7

Кількість бактерій у кишковому вмісті, зіскрібках слизу та гомогенаті тканини клубової кишки, log КУО/г (M ± SD)

Представники бактеріальної флори	Група тварин											
	Контроль (n=5)			Лінкоміцин (n=6)			Індометацин (n=6)			Метотрексат (n=6)		
	КВ	ЗС	ГТ	КВ	ЗС	ГТ	КВ	ЗС	ГТ	КВ	ЗС	ГТ
<i>Lactobacillus spp.</i>	6,5 ±0,45	2,1 ±0,37	2,6 ±0,37	2,1 ±0,51 **	–	–	3,8 ±0,16 **	1,8 ±0,16 *	2,3 ±0,38	2,8 ±0,16 **	1,5 ±0,36 *	2,3 ±0,38
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2,9 ±0,16	–	–	1,3 ±0,38 **	–	–	1,3 ±0,38 **	2,2 ±0,36	1,5 ±0,42	2,0 ±0,39 **	1,4 ±0,45	1,4 ±0,45
<i>Escherichia coli</i>	4,4 ±0,38	1,9 ±0,13	1,9 ±0,13	2,2 ±0,45 **	–	–	4,8 ±0,16	–	–	6,3 ±0,45 **	2,3 ±0,45	2,6 ±0,46
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,7 ±0,43	–	–	1,8 ±0,16	–	–	2,3 ±0,38 *	–	–	3,3 ±0,45 **	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,9 ±0,16	2,3 ±0,31
<i>E. coli (гемолітична)</i>	–	–	–	–	–	–	5,0 ±0,64	2,5 ±0,36	2,6 ±0,46	2,3 ±0,38	–	–
<i>Enterobacter gergovie</i>	–	–	–	2,1 ±0,46	–	–	1,7 ±0,37	–	–	2,5 ±0,42	1,9 ±0,55	1,6 ±0,33
<i>Citrobacter freundii</i>	–	–	–	2,2 ±0,42	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i>	–	1,3 ±0,38	1,1 ±0,31	1,8 ±0,16	–	–	–	–	–	2,0 ±0,39	1,2 ±0,36	1,1 ±0,29

Умовні позначення: КВ – кишковий вміст, ЗС – зіскрібок слизу, ГТ – гомогенат тканини.

На фоні введення лінкоміцину суттєво зменшувалася кількість бактерій у кишковому вмісті: так, для лактобацил цей показник зменшувався у 18333 рази ($p < 0,01$), для біфідобактерій у 31 раз ($p < 0,01$), кишкової палички у 36 разів ($p < 0,01$), а для ентерококу майже не змінювався. Також з'являлися представники алохтонної флори: бактерії родин *Enterobacter* та *Citrobacter*, а також дріжджеподібні гриби роду *Candida*. На посівах зіскрібків слизу та гомогенатах тканини росту

мікроорганізмів не відмічалось. При введенні індометацина зміни у складі бактеріальної флори кишкового вмісту були менш виражені: так, кількість лактобацил зменшувалася у 637 разів ($p < 0,01$), біфідобактерій – у 31 раз ($p < 0,01$); збільшилося число кишкової палички у 1,8 раза ($p < 0,01$), а ентерококу у 4,7 раза ($p < 0,05$) відповідно. Були виявлені умовно-патогенні бактерії: гемолітична кишкова паличка та бактерії родини *Enterobacter*. У посівах зіскрібків пристінного слизу були виявлені лактобацили, кількість яких була у 2,1 ($p < 0,05$) рази нижчою, ніж у контролі, а також біфідобактерії. Із умовно-патогенної мікрофлори визначалася гемолітична кишкова паличка. У гомогенатах тканини була встановлена наявність лактобацил (у 2 рази менше, ніж у контролі), біфідобактерій та гемолітичної кишкової палички.

При введенні метотрексата у складі кишкової флори знижувалася кількість лактобацил та біфідобактерій (у 6268 ($p < 0,01$) та 31 ($p < 0,01$) раз відповідно; кількість кишкової палички та ентерококу навпаки, збільшувалась у порівнянні з контролем (у 105 ($p < 0,01$) та 35 разів ($p < 0,01$) відповідно). Із умовно-патогенних мікроорганізмів були виявлені *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter gergovie*; а також визначалися дріжджоподібні гриби роду *Candida*. На посівах зіскрібків слизового шару та гомогенатах тканини відмічався ріст типової мікрофлори (лактобацил, біфідобактерій, кишкової палички) та умовно-патогенної (*Staphylococcus epidermidis*, *E. gergovie*) мікрофлори.

Слід відмітити, що погіршення функціонального стану кишки тісно пов'язане зі змінами мікробіоценозів. Причому у разі введення лінкоміцину саме зміни складу мікрофлори є вірогідною причиною змін функціонального стану кишки, оскільки цей препарат є нетоксичним у дозі, яку отримували шури в нашому дослідженні, тому можна виключити його дію на епітелій кишки [129]. З іншого боку, для індометацину та метотрексату невідомі будь-які ефекти, що безпосередньо впливають на активність бактерій, тобто можна констатувати, що зміни мікрофлори в цих випадках є вторинними, та виникли на фоні змін кишкового епітелію, викликаних введенням цих препаратів. Таким чином можна зазначити, що чим більший ступінь ураження кишкового епітелію, тим більша кількість ентеробактерій

та більший склад представників умовно-патогенної мікрофлори, що у свою чергу є несприятливим фактором для відновлення функцій слизової оболонки.

На початку нашого дослідження ми провели оцінку рухової функції тонкої кишки, оскільки відомо, що порушення перистальтики є характерною ознакою дисфункції кишечника, викликаного в тому числі дією мікроорганізмів. Так, при кишкових інфекціях швидкість транзиту кишкового вмісту зростає, що на фоні підсилення секреції електролітів сприяє “вимиванню” патогенів із порожнини кишки; з іншого боку, атонія кишки може призводити до більш тривалого контакту мікрофлори зі слизовою оболонкою і бути причиною дисбіотичних розладів. Було встановлено (табл. 3.8), що у щурів при введенні лінкоміцина швидкість транзиту кишкового вмісту суттєво не відрізнялася від контролю.

Таблиця 3.8

Швидкість транзиту кишкового вмісту у щурів контрольної та дослідних груп
($M \pm SD$; $n = 4$ у кожній групі)

Група тварин	Довжина тонкої кишки, см	Міграція активованого вугілля, см	Показник швидкості транзиту кишкового вмісту, %
Контроль	92,5±4,01	44,2±6,47	47,7±5,47
Лінкоміцин	92,0±4,17	45,3±3,75	49,4±6,21
Індометацин	95,5±3,82	61,4±5,00	64,4±4,94 *
Метотрексат	91,8±3,55	4,5±0,92	4,9±1,08 *

Але при введенні індометацина та метотрексата спостерігалися значні зміни цього показника: так, у щурів, яким вводили індометацин він збільшувався на 30%, а у щурів, які отримували метотрексат, навпаки, був значно меншим за показник контрольної групи і становив лише 10 % від норми.

Отримані результати пояснюються тим, що будь-які запальні зміни викликають збільшення синтезу простагландинів. При цьому відомо, що простагландини E та I пригнічують рухову функцію кишки, що і спостерігалось при ентериті, викликаному метотрексатом, який характеризувався найбільш вираженими ознаками запалення [288]. З іншого боку, індометацин — потужний

інгібітор їх синтезу, тому його введення може підсилювати рухову функцію ШКТ [162]. Затримку транзиту кишкового вмісту можна віднести до несприятливих факторів при запаленні та дисбактеріозі, оскільки за цих умов відбувається більш тривалий контакт умовно—патогенної флори з поверхнею слизової оболонки.

Наступним етапом дослідження була оцінка функціонального стану кишкового бар'єра. За нормальних умов він повинен виконувати взаємовиключні функції (з одного боку, бути проникним для поживних речовин та електролітів, а з іншого, протистояти дії патогенних бактерій, токсинів і харчових алергенів), Ця функція забезпечується завдяки синхронізації низки факторів, а саме швидкому відновленню клітин епітелію, секрецію слизу та деяких антимікробних поліпептидів. При порушенні будь-якої зі згаданих ланок бар'єрна функція кишкового епітелію може порушуватися. Нами було встановлено, що в усіх щурів із трьох дослідних груп спостерігалось зміни цього показника (рис. 3.4).

Слід відмітити, що у щурів, які отримували лінкоміцин, кількість адсорбованого нігрозину була підвищеною на 20% ($p > 0,05$) у порівнянні з контрольною групою, але ця різниця виявилася статистично незначущою. У щурів при введенні індометацина цей показник був більшим за значення у тварин контрольної групи на 32% ($p < 0,05$), а при введенні метотрексату на 51% ($p < 0,05$).

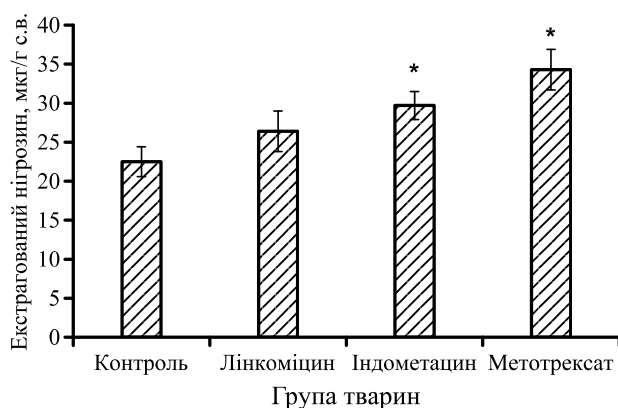


Рис. 3.5. Кількість адсорбованого вітального фарбника (нігрозину) в ізольованій кишковій петлі щурів контрольної та дослідних груп ($M \pm SD$; $n = 4$ у кожній групі).

Відомо, що слиз, який вкриває поверхню ШКТ, складається з двох шарів: зовнішнього, який легко видаляється, та внутрішнього, міцно прикріпленого до

поверхні слизової оболонки. Якщо зовнішній шар слизу в здоровому організмі переважно заселений бактеріями-симбіонтами, то внутрішній — залишається стерильним [318]. При патологічних процесах умовно-патогенна мікрофлора, що синтезує протеолітичні ферменти, здатна призводити до деградації внутрішнього слизового шару та міграції як патогенної, так і симбіотичної мікрофлори безпосередньо до клітин епітелію кишки. Потрапивши до поверхні слизової оболонки патогенні бактерії поглинаються дендритними клітинами або потрапляють у власну пластинку кишки, що призводить до гіперактивації імунної відповіді, та ще більшого ураження тканини кишки під впливом антимікробних поліпептидів нейторофілів, які у значних кількостях мігрують до ділянок ураження. Таким чином отримані результати про порушення бар'єрної функції кишкового епітелію у тварин, які отримували індометацин та метотрексат, можна віднести до несприятливих для відновлення тканини кишки факторів.

Нормальне здійснення бар'єрної функції кишки є результатом узгодженої дії низки механізмів, в яких головні ролі відіграють тісні контакти ентероцитів, слиз, котрий секретується келихоподібним клітинам та антимікробні пептиди клітин Панета. Тому ми більш ретельно дослідили ступінь ураження слизової оболонки клубової кишки щурів, використавши для цього методи мікроморфометричного аналізу тканини кишки (табл. 3.9). У щурів усіх дослідних груп слизова оболонка характеризувалася наявністю ознак ураження різного ступеня тяжкості. Найменше ці зміни були виражені у щурів при введенні лінкоміцина. Часто зустрічалися деформовані ворсинки, але без ерозій та десквамації епітеліальних клітин. Кількість келихоподібних клітин і клітин Панета була збільшеною у порівнянні з контролем (на 45 ($p < 0,01$) та 50 % ($p < 0,01$) відповідно). Виявлялись ознаки інфільтрація тканини кишки лейкоцитами. У щурів при введенні індометацина ці зміни були виражені більшою мірою: так, на відміну від щурів із дисбактеріозом у ворсинках окрім деформацій, була наявна ерозія їх апікальних відділів, також були виявлені очагові виразкові ураження слизової оболонки. Кількість келихоподібних клітин та клітин Панета не відрізнялася від контрольних значень. Інфільтрація тканини кишки лейкоцитами була більш вираженою. У слизовій оболонці кишки щурів, що

отримували метотрексат, був явно виражений набряк власної пластинки кишки, майже всі ворсинки були з ознаками некротичних змін, відмічалася масивна десквамація кишкового епітелію. Кількість келихоподібних клітин у ворсинках була зменшеною і становила лише 30 % ($p < 0,01$) щодо контролю, кількість клітин Панета не відрізнялась від контролю. Інфільтрація тканини кишки лейкоцитами була максимальною з усіх досліджених груп.

Таблиця 3.9

Мікроморфометричні показники та ступінь інфільтрації лейкоцитами епітелію клубової кишки щурів контрольної та дослідних груп
($M \pm SD$; $n = 6$ у кожній групі)

Морфометричний показник	Група тварин			
	Контроль	Лінкоміцин	Індометацин	Метотрексат
Довжина ворсинок, мкм	320,3±4,82	273,2±14,38 **	269,8±20,35 **	275,2±6,21 **
Ширина ворсинок, мкм	68,9±2,79	88,9±6,31 **	94,4±7,6 **	105,6±4,25 **
Кількість морфологічно змінених ворсинок, %	4,5±1,93	16,5±1,43 **	37,3±4,40 **	100±0,00 **
Середня кількість келихоподібних клітин у ворсинці	12,2±1,78	17,5±2,17 **	10,2±4,24	3,7±1,49 **
Глибина крипти, мкм	168,1±8,82	128,2±14,38 **	183,9±18,54 **	185,5±12,23 **
Ширина крипти, мкм	41,9±2,74	48,4±7,85 *	45,9±3,25	35,7±2,45 *
Кількість клітин Панета в крипті	4,6±0,32	6,7±0,27 **	4,9±0,24	4,8±0,49
Кількість лейкоцитів в полі зору	9,6±1,70	15,2±3,11 **	23,3±1,78 **	30,5±2,41 **

Існують певні ефективні механізми адаптації тканини кишки до умов збільшеного тиску умовно-патогенної флори на фоні зменшення кількості бактерій-симбіонтів, які за нормальних умов виконують захисні функції. Так, у щурів при введенні лінкоміцину, на фоні запалення виявлялися добре виражені компенсаторні явища на рівні тканини кишки. До них можна віднести, по-перше, збільшення келихоподібних клітин, та відповідно, гіперсекрецію слизу, який виконує бар'єрну функцію, особливо відносно аеробних бактерій, а по-друге, це збільшення кількості клітин Панета, що повинно призводити до посилення секреції антимікробних

пептидів у відповідь на дію бактерій. У щурів, які отримували індометацин та метотрексат, явища компенсації не спостерігались, а ступінь ураження кишки був значно більшим, з ознаками некрозу тканини. Здійснення компенсаторних явищ на рівні тканини кишки забезпечується збільшенням швидкості оновлення клітин кишкового епітелію, тобто повинна відбуватися активація сигнальних шляхів, які прискорюють проліферацію та диференціацію стовбурових клітин. Однією з таких сигнальних молекул є простагландин E₂, який є частиною головного механізму регуляції диференціації загального пулу соматичних стовбурових клітин [197]. Вплив умовно-патогенної мікрофлори індукує процес запалення і, відповідно, збільшення рівня синтезу простагландинів та інших факторів, що скеровують і прискорюють проліферацію та диференціацію клітин кишкового епітелію. Непрямі ознаки прискорення кругообігу клітин кишкового епітелію спостерігались у тварин при введенні лінкоміцина (зменшення глибини кишкових крипт, які є зоною диференціації та росту клітин кишкового епітелію, що свідчить про активну міграцію клітин у напрямку кишкових ворсинок), а при введення індометацина та метотрексата, навпаки, затримувалася проліферація та диференціація.

При введенні індометацина синтез простагландинів пригнічується, тому проліферативна здатність кишкового епітелію може знижуватися. Збільшення глибини кишкових крипт у цьому разі може свідчити про затримку диференціації та міграції клітин у напрямку ворсинок, і відповідно, погіршення репаративних процесів епітелію та зниження його компенсаторних властивостей. Метотрексат є антиметаболітом—антагоністом фолієвої кислоти, в зв'язку із антифолієвими ефектом пригнічує клітинний мітоз, і ріст активно проліферуючих тканин. Тому він блокуючи проліферативну здатність стовбурових клітин кишки, суттєво знижує або зовсім унеможлиблює здатність епітелію до регенерації, навіть при підвищеному рівні синтезу простагландинів. Результати нашого дослідження свідчать саме про це, оскільки спостерігалось значне зменшення кількості келихоподібних клітин, число клітин Панета не збільшувалося, а також збільшення глибини кишкових крипт.

Клітини Панета є важливою місцевою ланкою антимікробного захисту тонкої кишки, які можуть брати участь у регуляції запалення, тому заключним етапом нашого дослідження була оцінка їх функціонального стану за такими показниками, як вміст катіонних білків та цинку (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Площа секреторних гранул клітин Панета щурів із дизбактеріозом, забарвлених дитизоном та бромфеноловим синім ($M \pm SD$)

Група тварин	n	Площа секреторних гранул, мкм ²	
		Дитизон	Бромфеноловий синій
Інтактні	5	99,5±3,72	79,7±7,47
Лінкоміцин	6	80,6±6,85 **	58,0±5,75 **
Індометацин	6	65,8±5,90 **	54,3±4,29 **
Метотрексат	6	48,9±2,75 **	42,7±1,80 **

У щурів усіх дослідних груп порівняно з контрольними тваринами вміст катіонних білків та цинку в клітинах Панета зменшувався, що свідчить про значну активацію їх секреторної функції, особливо при тяжкому метотрексатовому ентериті. Так у тварин які отримували лінкоміцин, площа забарвлених дитизоном гранул була меншою на 19% ($p < 0,01$), а бромфеноловим синім – на 27% ($p < 0,01$) меншою, ніж в контролі. У тварин, які отримували інгібітор ЦОГ (індометацин) площа забарвлених дитизоном гранул була меншою на 34% ($p < 0,01$), бромфеноловим синім – на 32% ($p < 0,01$), а у тварин після введення метотрексата площа забарвлених дитизоном гранул була меншою на 51% ($p < 0,01$), а бромфеноловим синім – на 46% ($p < 0,01$) меншою, ніж у контрольній групі.

Зменшення секреції слизу, відсутність компенсаторного збільшення кількості клітин Панета може сприяти активній експансії умовно-патогенної мікрофлори як у слизовий шар, так і у слизову оболонку. Саме на цьому фоні суттєво підсилюється секреторна активність клітин Панета, яке можна пояснити наступним чином. По-перше, викид великої кількості катіонних білків у ділянках запалення та некрозу запобігає інфікуванню тканини кишки патогенними мікроорганізмами, а також

сприяє міграції лейкоцитів до ділянок ураження. По-друге, виділення клітинами Панета секреторної фосфоліпази A2 та ФНП- α може призводити до індукції процесів запалення та регенерації тканини кишки; так, наприклад, секреторна фосфоліпаза A2 впливає на активацію циклооксигенази-2 та збільшує цитокінопосередкований синтез простагландинів [326]. У свою чергу, виділення лейкоцитами цитокінів може паракринним шляхом стимулювати синтез і секрецію антимікробних пептидів клітинами Панета.

Таким чином нами були отримані попередні результати, що за умов запальної реакції у тонкій кишці, яка виникає внаслідок порушення різних фізіологічних механізмів підтримки гомеостазу її слизової оболонки, спостерігається підвищена секреторна активність клітин Панета. Відносно подальшої долі цинку, який вивільняється у позаклітинний простір у великих кількостях разом із секреторним матеріалом клітин Панета, не існує загальноприйнятої думки. Але правомірним здається припущення про те, що він може реабсорбуватися, розташованими поряд з клітинами Панета, стовбуровими клітинами кишки, здійснюючи при цьому антиапоптотичну функцію в умовах оксидативного стресу, зумовленого активацією нейтрофілів під час запалення та підвищеного вмісту бактеріальних ліпополісахаридів, що утворюються внаслідок загибелі бактерій [151].

3.6 Узагальнення результатів визначення оптимальної моделі альтерації слизової оболонки тонкої кишки

У результаті аналізу результатів попередніх досліджень щодо визначення оптимальної моделі альтерації слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки для подальшого вивчення фізіологічного значення іонів Zn^{2+} у регуляції функціонального стану слизової оболонки при запальному процесі нами були визначені наступні критерії для речовини – індуктора запалення. На нашу думку індуктор запалення повинен:

1. мати чітко визначений фізіологічний механізм дії;
2. не викликати суттєвих змін стану окремих органів та систем окрім ШКТ;
3. викликати ушкодження переважно слизової оболонки кишки;

4. забезпечувати можливість відновлення нормального стану слизової оболонки тонкої кишки для дослідження динаміки розвитку запальної відповіді;
5. мати мінімальну загальну токсичність.

У таблиці 3.11 наведені результати оцінки відповідності вивчених моделей альтерації СОТК визначеним критеріям дослідження.

Таблиця 3.11

Відповідність досліджених моделей альтерації слизової оболонки тонкої кишки визначеним критеріям дослідження

Модель альтерації СОТК	Доза речовини	Відповідність визначеним критеріям					Кількість балів
		Визначений механізм дії	Відсутність суттєвих змін органів та систем окрім ШКТ	Селективність ураження СОТК	Можливість відновлення СОТК	Мінімальна токсичність	
Токсична ентеропатія Солі важких металів	Токсична	+	–	–	+	–	2
Цинкова депривація Дієта з обмеженим вмістом цинку	–	+	–	–	+	+	3
Блокування проліферативної здатності стовбурових клітин Метотрексат	Надтерапевтична	+	–	±	–	–	1,5
Дисбактеріоз Антибактеріальні препарати	Терапевтична	±	+	±	+	+	4,5
Інгібування циклооксигенази Неселективні інгібітори ЦОГ	Надтерапевтична	+	+	+	+	±	4,5

Примітка: + модель задовольняє зазначеному критерію (1 бал); ± модель частково задовольняє зазначеному критерію (0,5 бали); – модель не задовольняє зазначеному критерію (0 балів).

Використання солей токсичних важких металів (кадмію, ртуті, свинцю, миш'яку тощо) є одним із способів моделювання ентеропатій. Зазвичай хронічне пероральне уведення даних сполук призводить до ініціації запальної відповіді та посилення секреторної активності клітин слизової оболонки тонкої кишки [147, 91,

90, 198]. Механізм їх шкідливої дії на клітини організму у першу чергу пов'язаний із підвищеною здатністю утворювати комплекси або “ліганди” з органічними сполуками. Ці модифіковані біомолекули втрачають біологічно-активні властивості, що у наслідку призводить до порушення функцій або загибелі клітин. Найбільш часто у формування лігандів із важкими металами залучаються атоми кисню, сірки та нітрогену. Коли важки метали утворюють зв'язки із цими елементами, які входять до складу біомолекул, може відбуватись інактивація важливих ензиматичних систем, або порушуватись структура протеїнів. Також важки метали призводять до надлишкового продукування у клітинах активних форм кисню, що призводить до перекисного окиснення ліпідів, протеїнів, інактивації ензимів та ушкодження ДНК [138]. Саме такий механізм шкідливої дії важких металів на клітини унеможлиблює селективне ушкодження слизової оболонки тонкої кишки, оскільки чутливими до дії катіонів токсичних металів є майже усі клітини організму.

Досліджена нами модель токсичної ентеропатії, яка виникає внаслідок уведення хлоридів важких металів (ртуті та кадмію) у застосованих концентраціях, та, як було встановлено, призводить не тільки до зменшення вмісту іонів Zn^{2+} та катіонних білків у секреторних гранулах клітин Панета, а також викликає дегенеративні зміни у цих клітинах, але мало впливає на інші типи клітин кишкового епітелію. Саме тому нами було відхилено подальше використання даної моделі для проведення досліджень ролі іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки тонкої кишки за умов запалення.

Модель аліментарного дефіциту цинку, яка супроводжується ентеропатією, має визначений фізіологічний механізм, оскільки цинк є потужним протизапальним агентом та антиоксидантом, його дефіцит в організмі призводить до ініціації запального процесу у ШКТ [271]. В умовах *in vitro* у клітинах лінії Caco-2 дефіцит цинку призводить до вираженої міграції нейтрофілів крізь ушкоджені міжклітинні контакти та підвищення рівня експресії хемокинів, і, відповідно, сприяє у такий спосіб ушкодженню слизової оболонки кишки. Щури із дефіцитом цинку мають більш високу концентрацію метаболітів оксиду азоту у сліпій кишці і підвищений

рівень експресії гену індукцибельної синтази оксиду азоту у відповідь на дію прозапальних агентів [346, 115]. Дефіцит цинку також може сприяти виникненню таких хронічних запальних захворювань кишки як целиакія та запальна хвороба кишки [145].

Однак дефіцит даного МЕ в організмі тварин викликає суттєві зміни усіх без виключення органів та систем, а не тільки тонкої кишки [271]. Також треба зазначити, що на даний час існує велика кількість опублікованих досліджень біофізичних, біохімічних, фізіологічних та інших показників функціонального стану кишкового епітелію за умов цинкового дефіциту, що суттєво обмежує можливість отримання принципово нових наукових результатів.

Модель запалення кишки з використанням цитостатичного препарату – метотрексата (антиметаболіту фолієвої кислоти) є доволі поширеною та має визначений механізм дії, проте не відповідає усім іншим визначеним критеріям. Доза метотрексата, необхідна для блокування проліферації стовбурових клітин кишки і, відповідно, індукції запальної відповіді, є токсичною. Тому дана модель характеризується прогресивним перебігом внаслідок рециркуляції метаболітів метотрексата і не передбачає повного відновлення стану кишкового епітелію; у залежності від дози препарату відбувається абсолютна летальність щурів впродовж трьох діб – двох тижнів [131]. Також блокуються усі без виключення швидко проліферуючі клітини, у тому числі клітини мієлоїдного ростку кісткового мозку. Оскільки у нашому дослідженні, у тому числі, потрібно було визначити і динаміку відновлення функціонального стану епітелію слизової оболонки тонкої кишки, дана модель виявилася неприйнятною для подальшого застосування.

Використання антибіотиків, хоча й може бути визнаною однією з оптимальних моделей ушкодження слизової оболонки кишки, але на наше переконання не у повній мірі відповідає першому критерію, а саме – має не повністю визначений фізіологічний механізм дії. Дійсно, запалення кишки у даній моделі відбувається опосередковано, лише як наслідок дії антибактеріальних препаратів на мікрофлору кишки. Враховуючи наявність індивідуальних та

сезонних особливостей у складі мікрофлори окремих тварин, можливість потрапляння бактерій з їжею та крос-контамінацію, а також особливості у силі імунної відповіді окремих особин, важко очікувати достатньо однотипної запальної реакції у дослідних групах. Проте зазначимо, що на наше переконання у разі можливості використання сучасних методик утримання тварин у стерильних умовах (гнотобіотичні тварини) та новітніх методів досліджень, за допомогою яких можна врахувати складні особливості взаємодії бактерій між організмом та власне між окремими мікробними популяціями, саме ця модель є найбільш перспективною для подальших досліджень ролі мікрофлори у розвитку запальної хвороби кишки.

Використання неселективних інгібіторів ЦОГ майже повністю відповідає визначеним нами критеріям що до оптимальної моделі альтерації слизової оболонки тонкої кишки для дослідження ролі іонів Zn^{2+} у регуляції її функціонального стану. По-перше ці препарати мають чітко визначений фізіологічний механізм дії, який полягає у неселективному пригніченні циклооксигенази. У дозах, які не викликають значних кишкових кровотеч (до 2,5-5,0 мг/кг для індометацина та 50-150 мг/кг для диклофенака), гарантована можливість відновлення слизової оболонки ШКТ. При уведенні годованим тваринам інгібітори ЦОГ викликають переважно ушкодження тонкої кишки, а при уведенні натщесерце – слизової оболонки шлунка [152]. Одноразове уведення інгібіторів ЦОГ викликає гостру запальну відповідь, яка триває до 7-10-ти діб, а дворазове уведення, з інтервалом у 24 години, призводить до розвитку тривалого хронічного запального процесу у тонкій кишці [125]. Однак індометацин, який був використаний у наших попередніх дослідженнях є одним з найбільш токсичних препаратів з групи НПЗП. Тому більш оптимальним треба визнати використання такого неселективного інгібітору ЦОГ як диклофенак (2-(2-(2,6-дихлорфеніламіно)феніл)оцтова кислота), який як і індометацин (1-(4-хлорбензоїл)-5-метокси-2-метил-1H-індол-3-оцтова кислота) за хімічною структурою відноситься до похідних оцтової кислоти, але має значно меншу загальну токсичність [109].

РОЗДІЛ 4

РОЛЬ ІОНІВ Zn^{2+} У ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ДІЇ ІНГІБІТОРУ ЦИКЛООКСИГЕНАЗИ ДИКЛОФЕНАКУ

4.1 Вміст цинку у слизовій оболонці клубової кишки, паренхімі печінки та сироватці крові щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Іони Zn^{2+} відіграють важливу роль у регуляції запальної реакції, оскільки вони є потужним протизапальним агентом [271]. Дана властивість обумовлена його регуляторним впливом на транскрипційний фактор NF κ B, який відіграє головну роль у розвитку запальної та імунної відповіді. Один з механізмів пригнічення іонами Zn^{2+} активності NF κ B пов'язаний із його впливом на експресію A20 – протеїну з “цинковими пальцями”, який ізолює NF κ B у цитоплазмі та пригнічує у такий спосіб ІЛ-6 та TNF- α опосередковану активацію даного транскрипційного фактора [54]. В умовах *in vitro*, цинк збільшує активність A20, що у наслідку призводить до зниження активації NF κ B та зменшення експресії генів прозапальних цитокінів TNF- α , ІЛ-1, ІЛ-8 [63]. Таким чином зниження внутрішньоклітинної концентрації іонів Zn^{2+} ускладнює гальмування NF κ B сигнального шляху і, як наслідок, підтримує стан хронічного запалення у тканині [271]. Показано, що запальні процеси в організмі супроводжуються перерозподілом обмінного пулу цинку між плазмою крові та паренхімою печінки; концентрація вільних іонів Zn^{2+} у плазмі знижується, а у паренхімі печінки навпаки, зростає [110, 111, 268, 269]. Зниження концентрації цинку в організмі, як наслідок порушення його абсорбції, збільшення екскреції, гіпоальбумінемії та перерозподілу пулу вільних іонів Zn^{2+} часто виникає й при запаленні тонкої кишки [227, 156]. Дефіцит цього МЕ за даних умов може негативно впливати на імунну функцію, окисно-відновлювальний потенціал тканини кишки та репаративні процеси у її слизовій оболонці [317, 302, 134]. Тому значне та тривале зниження концентрації цинку в організмі при

запальному процесі будь-якої локалізації є несприятливим фактором його розвитку [271].

Зважаючи на вищевикладені факти, першим завданням, яке вирішувалось у нашому дослідженні, було визначення, яким чином змінюється обмінний пул цинку в організмі тварин: а) при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} ; б) за умов блокування ЦОГ; в) при комбінованій дії обох цих експериментальних впливів. Для дослідження цинкового статусу щурів були обрані найважливіші учасники обміну цього мікроелемента в організмі – дистальний відділ тонкої кишки, печінка та плазма крові.

Вплив модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на концентрацію цинку у плазмі крові щурів за умов блокування ЦОГ. Відповідно до отриманих результатів було встановлено, що у щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} лише на I добу концентрація цинку у плазмі крові щурів (табл. 4.1) була нижче на 36% ($p < 0,001$) ніж в контрольних тварин.

У тварин за умов блокування ЦОГ зниження концентрації даного МЕ було визначено у I та III добу; у ці інтервали часу значення даного показника були відповідно нижчі на 43% і 35% ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою. У більш пізній термін (V та VII доба) концентрація цинку у плазмі крові тварин цієї групи відповідала значенням контрольних тварин.

При модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ тварини характеризувалися більш вираженими змінами концентрації цинку в плазмі крові. Так на I добу даний показник у тварин при дозі іонофору 400 мг/кг був нижче на 42% ($p < 0,001$), а при дозі іонофору 1000 мг/кг – на 54% ($p < 0,001$) нижче, ніж у контрольних тварин. На III добу концентрація цього мікроелемента була нижче на 52% ($p < 0,001$) при дозі іонофору 400 мг/кг, а при дозі іонофору 1000 мг/кг – на 58% ($p < 0,001$), на V добу – на 47% ($p < 0,001$) і 51% ($p < 0,001$) і на VII добу – на 36% ($p < 0,001$) і 53% ($p < 0,001$) нижче, відповідно до зазначених доз іонофору.

Таблиця 4.1

Концентрація цинку в плазмі крові щурів
($M \pm SD$; N у кожній групі = 40)

Група тварин	Концентрація цинку, мкмоль/л			
	I доба (n = 10)	III доба (n = 10)	V доба (n = 10)	VII доба (n = 10)
Контроль	12,7±1,40	12,1±1,35	11,1±1,42	10,8±1,20
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	8,1±0,71 ***	11,2±1,12	10,5±1,12	10,8±1,30
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	7,3±1,30 ***	7,9±1,17 ***	11,4±0,67	11,5±1,20
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	7,4±1,53 ***	5,8±1,26 *** #### ++	5,9±1,36 *** #### +++	6,9±0,83 *** #### +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn ²⁺ на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	5,8±1,22 *** #### + \$	5,0±0,77 *** #### +++	5,4±0,94 *** #### +++	5,1±0,53 *** #### +++ \$\$\$

Примітка: тут і далі * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно контролю; #, ##, ### – відносно модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ (доза ДЕДТК 1000 мг/кг); +, ++, +++ – відносно блокування ЦОГ (доза диклофенака 50 мг/кг); \$, \$\$, \$\$\$ – відносно модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)

Концентрація цинку у плазмі крові щурів при комбінованому впливі модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ та блокування ЦОГ, порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ була нижче протягом усього терміну дослідження. Так при дозі іонофору 400 мг/кг на III добу цей показник був нижчий на 27% ($p < 0,01$), на V добу – на 48% та на VII добу – на 40% ($p < 0,001$) нижче. У тварин при дозі іонофору 1000 мг/кг концентрація цинку була відповідно нижче: на I добу – 21% ($p < 0,05$), на III добу – 37% ($p < 0,001$), на V добу – 53% ($p < 0,001$) і на VII добу – 56% ($p < 0,001$). Також було встановлено, що концентрація цинку у плазмі крові щурів при нижчій дозі іонофору (400 мг/кг) порівняно із тваринами, які отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) на I добу був нижче на 22% ($p < 0,05$), а на VII добу – на 27% ($p < 0,001$).

Вплив модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на концентрацію цинку у паренхімі печінки щурів за умов блокування ЦОГ. При визначенні концентрації цинку у паренхімі печінки (табл. 4.2) було визначено, що у тварин за умов модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} порівняно із контрольною групою збільшення концентрації даного мікроелемента на 12% ($p < 0,01$) відбувається лише на I добу дослідження.

Таблиця 4.2

Концентрація цинку в паренхімі печінки щурів
($M \pm SD$; N у кожній групі = 40)

Група тварин	Концентрація цинку, нмоль/г сирової ваги			
	I доба (n = 10)	III доба (n = 10)	V доба (n = 10)	VII доба (n = 10)
Контроль	227±18,0	220±19,6	219±24,8	237±14,3
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	253±14,5 **	230±16,8	224±12,0	229±12,0
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	329±25,5 ***	302±20,0 ***	255±10,7 **	234±13,1
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	274±11,0 ** ### +++	271±15,1 ** ## +++	272±9,8 ** #### ++	256±11,5 ** ## ++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	284±7,4 ** #### +++ \$	277±10,3 ** #### ++	281±22,4 ** #### ++	283±17,1 ** #### +++ \$\$

У тварин за умов блокування ЦОГ на I та III добу також спостерігалось підвищення концентрації цинку у паренхімі печінки. У зазначені часові інтервали вона перевищувала значення контрольних тварин на 45% ($p < 0,001$) та 40% ($p < 0,001$) відповідно. На V добу концентрація цинку у паренхімі печінки у тварин даної групи почала знижуватися, про що свідчить перевищення показників контрольних щурів лише на 16% ($p < 0,01$), а на VII добу – повністю відновлювалась.

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ концентрація цинку в паренхімі печінки на I добу також

збільшувалась (на 21% при дозі іонофору 400 мг/кг і 25% ($p < 0,01$) – при дозі іонофору 1000 мг/кг) і втримувалась на такому підвищеному рівні до VII доби включно. Варто зазначити, що у I та VII добу дослідження концентрація цинку у печінці щурів при дозі іонофору 1000 мг/кг була вище ніж у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг на 4% ($p < 0,05$) та 11% ($p < 0,01$) відповідно.

Вплив модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на концентрацію цинку у слизовій оболонці клубової кишки щурів за умов блокування ЦОГ. За результатами проведеної оцінки концентрації цинку в слизовій оболонці клубової кишки щурів (табл. 4.3) було встановлено, що у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , порівняно із контрольною групою, лише на I добу відбувалося збільшення цього показника на 17% ($p < 0,01$).

Таблиця 4.3

Концентрація цинку у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки щурів
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Концентрація цинку, нмоль/г сірої ваги			
	I доба ($n = 10$)	III доба ($n = 10$)	V доба ($n = 10$)	VII доба ($n = 10$)
Контроль	328±31,6	332±49,7	316±36,4	327±35,3
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	384±44,1 **	338±36,7	315±34,0	302±48,7
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	232±30,1 ***	237±61,4 ***	298±30,0	358±57,8
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	337±59,9 ## +++	218±43,7 *** #### ++	213±38,3 *** #### ++	194±37,4 *** #### +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	307±37,2 # +++	180±30,4 *** #### +++ \$	186±29,0 *** #### +++	191±28,2 *** #### +++

За умов блокування ЦОГ у тварин спостерігалась двофазна динаміка змін концентрації цинку в слизовій оболонці клубової кишки. Перша фаза – зниження

концентрації у середньому на 41% ($p < 0,01$) між I та III добою дослідження. Друга фаза – підвищення до значень контрольної групи на V – VII добу.

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} за умов блокування ЦОГ на I добу не відбувалося статистично значущих змін концентрації цинку в слизовій оболонці клубової кишки порівняно з контрольною групою. На III – VII добу було визначено зниження концентрації цинку у середньому на 52% ($p < 0,001$) при дозі іонофору 400 мг/кг на 84% ($p < 0,001$) – при дозі іонофору 1000 мг/кг.

Статистично значущі відмінності за цим показником між тваринами за умов одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ і тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, були наявні протягом усього терміну дослідження. на I добу концентрація цинку в слизовій оболонці клубової кишки у тварин при дозі іонофору 400 мг/кг перевищувала показники групи тварин, які отримували лише інгібітор ЦОГ на 55% ($p < 0,001$), а при дозі іонофору 1000 мг/кг – на 68% ($p < 0,001$) відповідно. У наступний термін цей показник був навпаки, нижчий ніж за умов звичайного блокування ЦОГ: на III добу на 9% ($p < 0,01$) при дозі іонофору 400 мг/кг і 24% ($p < 0,001$) – при дозі іонофору 1000 мг/кг, на V добу – на 29% ($p < 0,01$) і 38% ($p < 0,001$) і на VII добу – на 46% і 47% ($p < 0,001$) відповідно. Також зазначимо, що концентрація цинку в слизовій оболонці клубової кишки у тварин при дозі іонофору 1000 мг/кг була менше на 18% ($p < 0,05$), ніж у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг.

Отримані результати про зміни концентрації цинку в плазмі крові, паренхімі печінки та слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки свідчать про перерозподіл цинку в організмі тварин за умов запальної відповіді у кишці, індукованої блокуванням ЦОГ, та у цілому підтверджуються рядом досліджень обмінного пулу цинку при запальних захворюваннях різних органів [268, 269]. З літературних джерел відомо, що концентрація цинку у ділянці запалення та плазмі крові зменшується, а у паренхімі печінки навпаки, зростає [110, 111, 268, 269]. R. Milanino було показано, що асептичний плеврит у щурів призводить до статистично значимого збільшення концентрації цинку у печінці у період між 6 та

48 годинами після індукції запалення [110]. При асептичному запаленні кінцівки концентрація цинку у плазмі крові щурів несуттєво знижувалась лише період між 48-72 годинами, а у тканині ураженої ділянки знижувалась на 41% вже через 5 годин після індукції і втримувалась на низькому рівні до кінця дослідження [111]. Загальний механізм зменшення концентрації вільних іонів Zn^{2+} пояснюється підвищенням рівня синтезу металотіонеїну (МТ) у печінці та інших органах під час запальної відповіді [232]. Подібний перерозподіл цинку в організмі при запальному процесі пояснюється активацією синтезу металотіонеїнів (МТ) – стрес-індукованих металопротеїнів, одна з основних функцій яких полягає у депонуванні катіонів двохвалентних металів. Так, за даними J.C. Philcox у мишей з нормальною експресією гена *MT* (генотип *MT*⁺⁺) при уведенні ліпополісахариду, на фоні збільшення концентрації МТ у печінці відбувалось зменшення концентрації цинку у плазмі крові і кишковому вмісті, та збільшення – у печінці. У мишей з генотипом *MT*⁻⁻ подібних змін не спостерігалось [268, 270]. Відомо, що 1 моль МТ може утворювати координаційні зв'язки із 7 грам • атомами цинку, що дозволяє ефективно зменшувати концентрацію вільно циркулюючих іонів Zn^{2+} в організмі; тому головною функцією МТ при запальній відповіді є перерозподіл внутрішньоклітинних сховищ іонів Zn^{2+} [268, 269]. Причому даний металопротеїн може виконувати дві протилежні функції: або підвищувати концентрацію іонів Zn^{2+} у клітинах, і у такий спосіб сприяти метаболічним процесам у гостру фазу запалення, або навпаки, обмежувати біодоступність цинку для забезпечення максимальної активності ензимів, активність яких інгібується іонами Zn^{2+} [232]. При бактеріальних інфекціях експресія гену металотіонеїну у паренхімі печінки багатократно зростає, що дозволяє віднести цей протеїн до т.з. стрес-індукованих протеїнів “гострої” фази. Ліпополісахариди призводять до збільшення експресії гену МТ у печінці, нирках, підшлунковій залозі, кишці, легенях, серці, мозку, яєчниках, матці та селезінці [121]. Ця індукована ліпополісахаридами активація опосередковується дією прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП- α , інтерфероном- γ), а також нітрогену оксидом та глюкокортикоїдами [247]. Зазначені вище біоактивні речовини можуть індукувати синтез МТ як незалежно від ліпополісахаридів, так і діяти синергічно з ними, що дозволяє організму дуже

гнучко регулювати рівень експресії гену МТ в залежності від типу тканини та комбінації факторів [121, 114, 298, 294]. Активні форми кисню (АФК), які синтезуються під час запальної відповіді у слизовій оболонці кишки також активують експресію МТ [60, 178]. Таким чином, спираючись на дані літератури, визначені нами зміни концентрації цинку в досліджених органах тварин за умов запальної відповіді у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки, індукованою блокуванням ЦОГ, можна визначити як фізіологічно доцільні.

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} його концентрація в клітинах на I добу дослідження зростала. Дане явище пояснюється тим, що ДЕДТК у позаклітинному просторі утворює із цинком хелатний комплекс $[Zn : 2ДЕДТК]$. Комплекс що утворився має виражені ліпофільні властивості, власне завдяки чому ДЕДТК і відноситься до т.з. рухливих іонофорів, тобто сполук, здатних транспортувати іони крізь клітинні мембрани [208, 139]. Потрапляючи до клітин шляхом пасивного транспорту за градієнтом концентрації комплекс $[Zn : 2ДЕДТК]$ швидко (протягом 10–15 хв.) метаболізується ензимами тіолметилтрансферазою і тіопуринметилтрансферазою (КФ 2.7.1.67) до більш простих хімічних сполук, які втрачають здатність утримувати катіони металів [92, 285]. Отже при цьому відбувається вивільнення іонів цинку і, відповідно, підвищення його концентрації у клітині. Оскільки фізіологічна концентрація іонів Zn^{2+} в цитозолі лежить у межах $10^{-9} - 10^{-12}$ моль і перебуває під жорстким генетичним контролем, то збільшення його вмісту у клітинах внаслідок надлишкового транспорту може призводити до істотних змін сигнальних шляхів, у яких цинк бере участь [325, 328, 345].

Одночасна дія інгібітору ЦОГ та іонофору порушує механізми перерозподілу іонів Zn^{2+} в організмі тварин на самому початку запального процесу у тварин, оскільки концентрація даного МЕ у тканині дистального відділу тонкої кишки на I добу дослідження у даних тварин майже не змінювалась, на відміну від щурів, які зазнавали блокування ЦОГ, і у яких концентрація цинку у цей час знижувалась на 41% порівняно з контролем. У подальшому навпаки, у тварин які одночасно зазнавали впливу трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ спостерігались ознаки дефіциту цинку у тканині кишки та плазмі крові. Це може

бути обумовлено порушенням абсорбції цинку у кишці внаслідок запалення її слизової оболонки, гіпоальбумінемією та збільшенням екскреції цинку з організму [227, 156]. У даному випадку тривалий дефіцит цинку є несприятливим фактором розвитку запального процесу у тонкій кишці щурів, які зазнавали комбінованої за умов блокування ЦОГ та іонофору.

4.2 Кількісні та якісні показники пристінної мікрофлори дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Відомо, що мікрофлора кишки, яка є невід'ємним її компонентом і знаходиться у складних симбіотичних взаємовідносинах із макроорганізмом. Співтовариства мікроорганізмів за нормальних умов перебувають під жорстким контролем місцевого антибактеріального захисту організму хазяїна, але при зміні його реактивності можуть швидко набувати факторів вірулентності та ініціювати запальний або інфекційний процес [7, 20, 6, 18, 34, 35]. Було показано, що Грам-негативні бактерії відіграють одну з головних ролей у розвитку НПВП-індукованих ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки [335]. Уведення неселективних інгібіторів ЦОГ викликає у щурів суттєві зміни складу кишкової мікрофлори, що є найбільш вірогідною причиною альтерації слизової оболонки тонкої кишки за дії цієї групи фармакологічних препаратів [335, 192]. На користь цієї теорії свідчить ряд результатів досліджень. Так І. Vjarnason et al. (1992) та Т. Watanabe et al. (2008) було показано, що прийняття антибіотиків під час курсу терапії НПВП значно зменшує тяжкість уражень тканини кишки [233, 252]. Більш того, М. Uejima et al. (1996) продемонстрували, що у аксених мишей, яких утримували у стерильному середовищі, НПВП не викликають будь-яких ушкоджень слизової оболонки кишки. Однак при колонізації ШКТ таких щурів бактеріями *Escherichia coli* або *Eubacterium limosum* вони знову стають вразливими до дії неселективних інгібіторів ЦОГ [287]. НПВП у першу чергу ушкоджують слизову оболонку кишки, що сприяє активації TLR-рецепторів ліпополісахаридами, притаманними Грам-негативній мікрофлорі [252]. Саме

активацію цих рецепторів відносять до одного з ключових механізмів широкого кола ушкоджень кишки, який реалізується шляхом активації запальної відповіді у її слизовій оболонці [234]. Зважаючи на таку принципову роль, яку мікрофлора відіграє у процесах альтерації слизової оболонки тонкої кишки, важливим завданням для нашого дослідження було визначення того, яким чином буде змінюватись її склад за умов комбінованої за умов блокування ЦОГ та іонофору.

За результатами бактеріологічного аналізу зіскрібків пристінного шару слизу дистального відділу тонкої кишки тварин через одну добу після введення препаратів (рис. 4.1) було визначено, що у контрольних тварин до складу автохтонної мікрофлори входять бактерії наступних родин: *Bifidobacteria spp* ($2,78 \pm 0,31 \log \text{ КУО/г}$), *Lactobacillus spp* ($3,69 \pm 0,27 \log \text{ КУО/г}$), *Escherichia coli* ($2,75 \pm 0,30 \log \text{ КУО/г}$), *Enterococcus faecalis* ($2,68 \pm 0,39 \log \text{ КУО/г}$) і одноклітинні дріжджоподібні гриби роду *Candida* ($1,65 \pm 0,37 \log \text{ КУО/г}$).

Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} у тварин призводила до змін кількісного складу основних представників кишкової нормофлори, однак не впливала на її видовий склад. Так, кількість біфідобактерій знижувалась на 20% ($p > 0,05$), лактобацил на 14% ($p > 0,05$); кишкової палички навпаки, збільшувалась на 29% ($p > 0,05$), а ентерококу – зростала майже у 2 рази ($p < 0,001$). Також було виявлено збільшення кількості дріжджоподібних грибів роду *Candida* – на 16% ($p > 0,05$) порівняно з контрольною групою. Таким чином основною значимою зміною у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} є суттєве збільшення кількості *Enterococcus faecalis*, який хоча і є типовим представником кишкової мікрофлори, за умов зниженої резистентності організму може швидко набувати факторів вірулентності і бути причиною вкрай тяжких інфекцій [71]. Визначені нами зміни складу пристінної мікрофлори вказують на те, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , яке мало за мету збільшення трансмембранного потоку цього МЕ у клітини епітелію слизової оболонки тонкої кишки, порушувало механізми підтримки сталого складу кишкової мікрофлори у цій групі тварин.

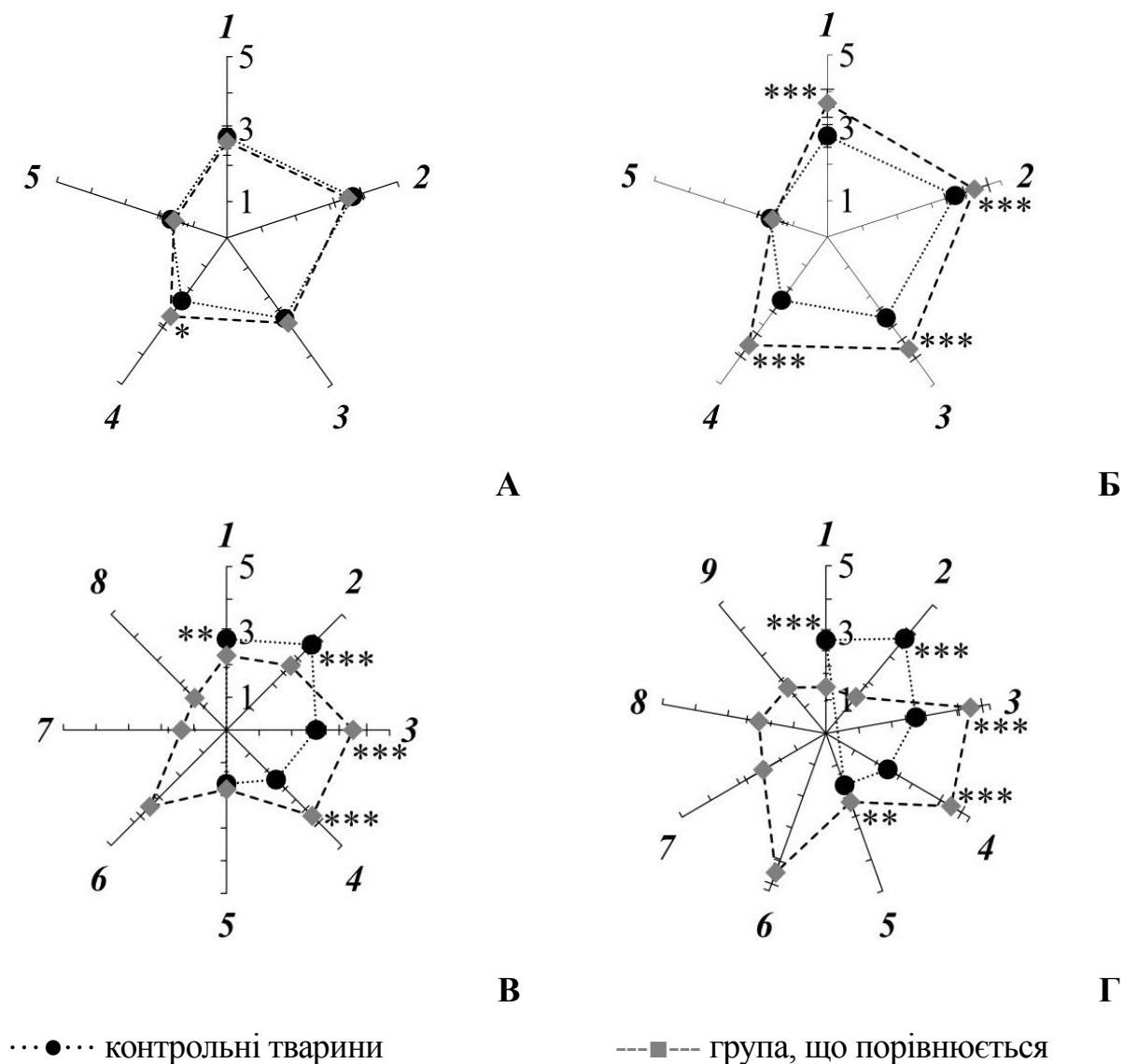


Рис. 4.1. Склад пристійної мікрофлори дистального відділу тонкої кишки щурів на I добу дослідження (log КУО/г) порівняно з контрольними тваринами. А – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} ; Б – блокування ЦОГ; В – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг); Г – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг). **Умовні позначення:** 1 – *Bifidobacterium spp*, 2 – *Lactobacillus spp*, 3 – *Escherichia coli*, 4 – *Enterococcus faecalis*, 5 – *Candida spp*, 6 – *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*, 7 – *Staphylococcus epidermidis*, 8 – *Streptococcus viridans*, 9 – *Acinetobacter haemolyticus*.

У тварин за умов блокування ЦОГ спостерігалися також винятково кількісні зміни мікрофлори, характерні для НПВП-індукованої ентеропатії [334,

335, 192]. Порівняно з контрольними тваринами, кількість біфідобактерій у них збільшувалась у 8,7 разу ($p < 0,001$), лактобацил – у 4,5 разу ($p < 0,001$), кишкової палички у 11,5 разу ($p < 0,001$), ентерококу – в 29,5 разу ($p < 0,001$). Кількість грибів роду *Candida* залишалась незмінною.

У тварин при одночасному модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокуванні ЦОГ спостерігалися набагато більш виражені зміни кишкової мікрофлори, причому як у кількісному співвідношенні окремих автохтонних видів, так і в якісному складі мікробіоценозу слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки. Із цих двох груп менш виражені порушення мікробного гомеостазу пристінного шару слизу спостерігалися у тварин, які отримували меншу дозу іонофору (400 мг/кг), у яких кількість біфідобактерій зменшувалась у 2,7 разу ($p < 0,001$), а лактобацил – у 7,8 разу ($p < 0,001$); кількість кишкової палички збільшувалась у 17,6 разу ($p < 0,001$), а ентерококу – у 29 раз ($p < 0,001$). Також були виявлені представники умовно-патогенної мікрофлори: *Cronobacter sakazakii* ($3,32 \pm 0,41$ log КУО/г), *Staphilococcus epidermidis* ($1,38 \pm 0,41$ log КУО/г) і гемолітичний штамп *Streptococcus viridans* ($1,38 \pm 0,41$ log КУО/г).

Збільшення дози іонофору до 1000 мг/кг за умов блокування ЦОГ призводило до ще більш виражених змін складу пристінної мікрофлори: кількість біфідобактерій зменшувалась у 20,3 раз ($p < 0,001$), а лактобацил – у 140 разів ($p < 0,001$); кишкової палички навпаки зростала у 51,5 разу ($p < 0,001$), а ентерококу — у 142,8 разу ($p < 0,001$). Більшою була і кількість представників умовно-патогенної мікрофлори: *Cronobacter sakazakii* – $4,42 \pm 0,36$ log КУО/г, *Staphilococcus epidermidis* ($2,18 \pm 0,60$ log КУО/г). гемолітична мікрофлора окрім *Staphilococcus viridans*, присутнього в кількості $2,05 \pm 0,37$ log КУО/г, поповнилася умовно-патогенним представником *Acinetobacter haemolyticus*, присутнім у кількості $1,78 \pm 0,31$ log КУО/г. Збільшення дози іонофору до 1000 мг/кг за умов блокування ЦОГ призводило до ще більш виражених змін складу пристінної мікрофлори: кількість біфідобактерій зменшувалась у 20,3 раз ($p < 0,001$), а лактобацил – у 140 разів ($p < 0,001$); кількість кишкової палички навпаки зростала

у 51,5 разу ($p < 0,001$), а ентерококу у 142,8 разу ($p < 0,001$). Більшою була і кількість представників умовно-патогенної мікрофлори: *Cronobacter sakazakii* – $4,42 \pm 0,36$ log КУО/г, *Staphylococcus epidermidis* ($2,18 \pm 0,60$ log КУО/г). гемолітична мікрофлора окрім *Staphylococcus viridans*, присутнього в кількості $2,05 \pm 0,37$ log КУО/г, поповнилася умовно-патогенним представником *Acinetobacter haemolyticus* ($1,78 \pm 0,31$ log КУО/г). Важливо відзначити, що у тварин обох цих груп ентерокок та кишкова паличка проявляли протеолітичні та гемолітичні властивості.

Отримані нами результати бактеріологічного дослідження свідчать про те, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ призводить до найбільш виражених дисбіотичних змін кишкової мікрофлори. Наявність гемолітичних штамів у цих тварин може бути пояснена кишковими кровотечами, а наявність значної кількості ентерококу із протеолітичними властивостями може бути обумовлена утворенням продуктів розпаду ушкодженої тканини кишки. Окремо варто відзначити факт наявності в складі пристінної мікрофлори тонкої кишки зазначених груп тварин груп бактерії *Cronobacter sakazakii*, яка часто розглядається як один з патогенетичних факторів розвитку виразкового коліту [175]. Збільшення кількості ентерококу і кишкової палички та поява умовно-патогенних бактерій у слизовому шарі тварин за комбінованої за умов одночасного моделювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ, може сприяти їх подальшій транслокації у тканину тонкої кишки [241, 309]. Більш того, саме збільшення коменсалів у слизовому шарі кишки за результатами, отриманими М.Е. Johansson et al. (2010), є характерною ознакою початку запального процесу в моделі коліту, індукованого введенням декстрану сульфату [67].

Підсумовуючи отримані факти можна зробити висновок, про те, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} за умов блокування ЦОГ суттєво змінює реалізацію механізмів місцевого антибактеріального захисту епітелію тонкої кишки, за рахунок чого певної переваги над симбіотичною мікрофлорою набувають бактерії-коменсали та умовно-патогенна мікрофлора. Збільшення кількості останніх у подальшому може бути причиною більш

вираженої та тривалої активації місцевих механізмів неспецифічного антибактеріального захисту та призводити до подальшого ушкодження слизової оболонки тонкої кишки [70, 291].

4.3 Морфофункціональні показники епітеліального бар'єру слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Одношаровий кишковий епітелій являє собою фізичний та функціональний бар'єр між організмом та зовнішнім середовищем. Він регулює абсорбцію поживних речовин, транспорт води і електролітів та слугує першим захисним бар'єром від токсинів і кишкових патогенів. Речовини-подразники, прозапальні цитокіни, токсини, патогени та інші несприятливі фактори кишкового вмісту призводять до розкриття щільних контактів та збільшення міжклітинної проникності. Пригнічення експресії прозапальних цитокінів, вплив факторів росту та пробіотиків навпаки, чинить захисний ефект на епітелій слизової оболонки кишки. Порушення бар'єрної функції кишкового епітелію є наслідком активації сигнальних шляхів, які призводять до зниження експресії протеїнів щільних контактів. Дисфункція кишкового бар'єру супроводжує запальну хворобу кишки, целиакію, інфекційну діарею тощо [93]. Неселективні інгібітори ЦОГ є одним з найпоширеніших фармакологічних препаратів, прийом яких часто призводить до ушкодження слизової оболонки тонкої кишки і, відповідно, до дисфункції її епітеліального бар'єру [84, 335]. Показовими є результати досліджень J.L. Goldstein et al. (2005) та L. Maiden et al. (2005), згідно до яких прийом впродовж 2-х тижнів НПЗП напроксена призводить до виразкових уражень слизової оболонки тонкої кишки у 55%, а диклофенака – у 68-75% здорових волонтерів [330, 282]. У хворих на артрит, які повинні приймати НПЗП тривалий час, ушкодження слизової оболонки тонкої кишки спостерігаються більше ніж у 70% обстежених [332]. Саме ця

особливість дії неселективних інгібіторів ЦОГ на слизову оболонку тонкої кишки обумовлює достатньо широке засовування цієї групи препаратів для моделювання запальної хвороби кишки у тварин [229, 124].

Вищезазначена зазначена здатність НПЗП до ульцерогенної дії потребувала з'ясування того, як впливає модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на ступінь ушкоджень слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, індукованих неселективним інгібітором ЦОГ.

У контрольних щурів та у тварин, які зазнавали впливу модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} видимих ознак ушкодження слизової оболонки тонкої кишки виявлено не було (рис. 4.2 А).

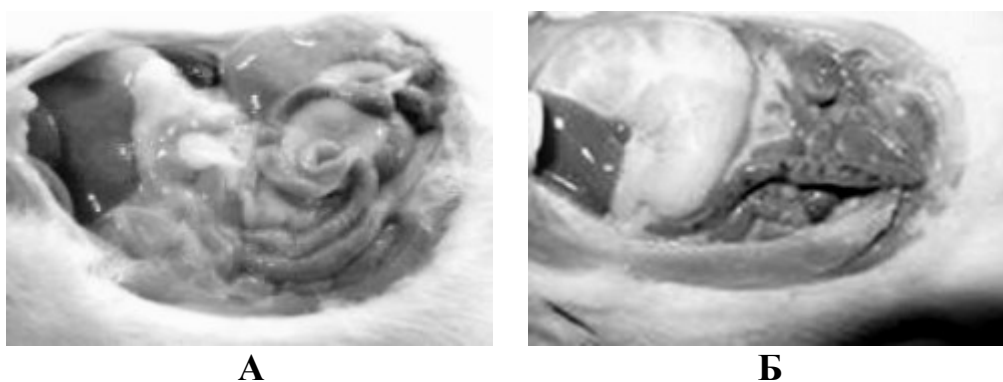


Рис. 4.2. Лапароскопічна оцінка стану тонкої кишки щурів на I добу дослідження. А – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , Б – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (ДЕДТК 1000 мг/кг + диклофенак 50 мг/кг). Зірочками позначені гематоми у серозній оболонці тонкої кишки.

У тварин при блокуванні ЦОГ тільки при ретельному огляді можна було виявити точкові гематоми на поверхні серозної оболонки кишки, а візуальних ознак кровотечі (наявності крові у порожнині кишки) у них не спостерігалось. У тварин за умов одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ (рис. 4.2 Б) спостерігались великі гематоми у серозній оболонці тонкої кишки, що є ознакою глибоких уражень її слизової оболонки, та підслизового шару; порожнина кишки була заповнена кров'ю.

Подальший макроскопічний аналіз слизової оболонки підтвердив попередні спостереження щодо тяжкості ушкодження тонкої кишки у зазначених групах

тварин. Слизова оболонка тонкої кишки тварин за умов блокування ЦОГ характеризувалася наявністю невеликих виразок, розташованих як уздовж, так і поперек осьової лінії кишечника (рис. 4.3 Б). При модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (доза іонофору 400 мг/кг) у тварин ступінь уражень була більшою, як за площею, так і за глибиною виразок, із явними ознаками кровотечі з виразкових уражень (рис. 4.3 В). При збільшенні дози іонофору до 1000 мг/кг виразкові ураження слизової оболонки були максимально виражені серед усіх груп; на дні глибоких виразок були присутні фібринові згустки, а м'язи кишки навколо ушкоджених ділянок слизової оболонки були спазмовані, що добре видно на рис. 4.3 Г.

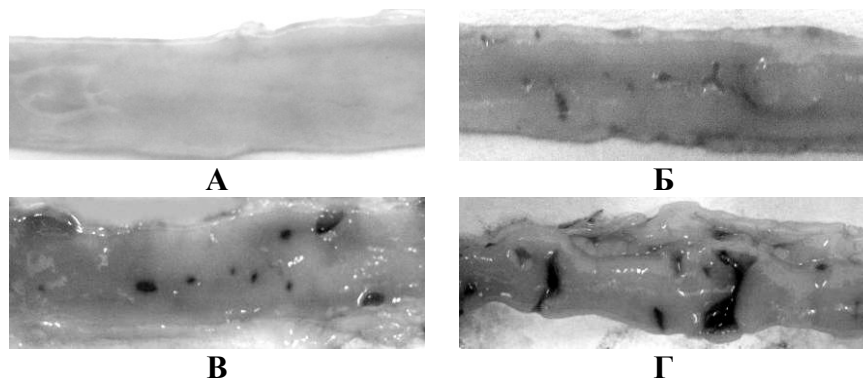


Рис. 4.3. Виразкові ушкодження слизової оболонки тонкої кишки на I добу дослідження. А – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} ; Б – блокування ЦОГ; В – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (ДЕДТК 400 мг/кг + диклофенак 50 мг/кг); Г – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (ДЕДТК 1000 мг/кг + диклофенак 50 мг/кг). Зірочками позначені виразки слизової оболонки.

За результатами оцінки площі виразок слизової оболонки тонкої кишки тварин (рис. 4.4) було встановлено, що на I добу дослідження площа виразкових уражень у тварин при блокуванні ЦОГ дорівнювала 7%, а у тварин при одночасному блокуванні ЦОГ та модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} відповідно дорівнювала 13% (доза іонофору 400 мг/кг) і 17% (доза іонофору 1000 мг/кг) на 1 см² поверхні. На III добу значення цього показника для тварин зазначених груп дорівнювали відповідно 5%, 11% і 16% на 1 см² слизової оболонки тонкої кишки і на V добу – 3%, 10% і 14% відповідно. На VII

добу виразки визначалися тільки у тварин, які одночасно зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ; при цьому їх площа при дозі іонофору 400 мг/кг становила 6%, а при дозі іонофору 1000 мг/кг – 9% на 1 cm^2 слизової оболонки кишки.

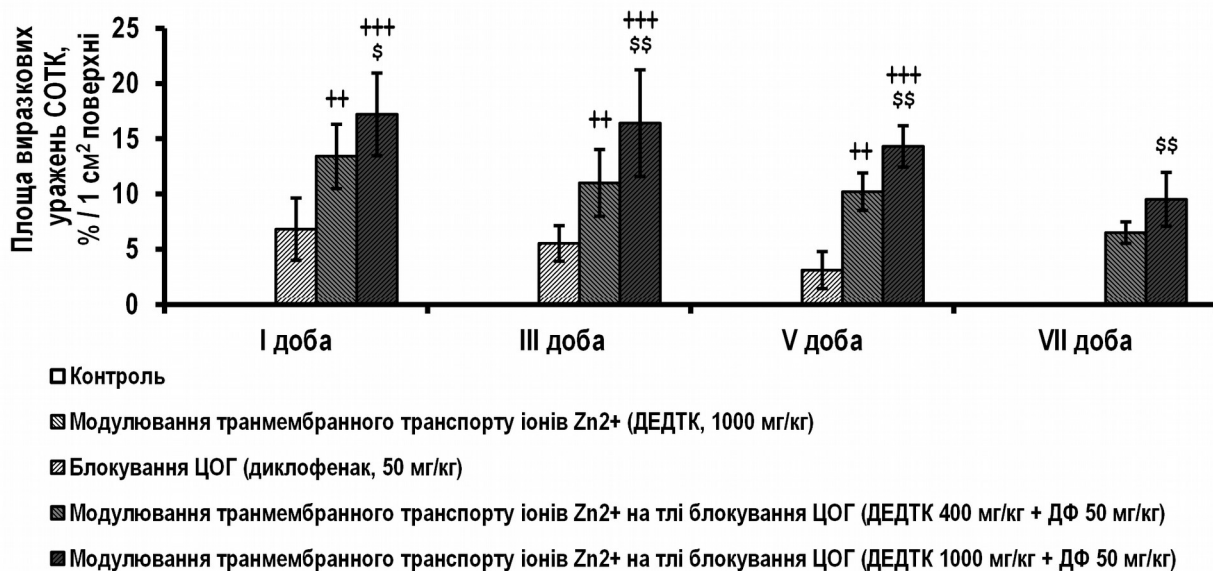


Рис. 4.4. Відносна площа виразкових уражень слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки у щурів у I-VII добу дослідження. ($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі).

Важливо відзначити, що площа виразкових уражень слизової оболонки тонкої кишки у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ при дозі іонофору 400 мг/кг порівняно із щурами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, була більшою на I добу на 96% ($p < 0,01$), на III добу – у 2,5 рази ($p < 0,01$) та на V-VII добу – у 3,3 ($p < 0,01$) рази, а при збільшенні дози іонофору до 1000 мг/кг – більшою відповідно у 2,5 ($p < 0,001$), 3 ($p < 0,001$) і 4,6 ($p < 0,001$) рази. Площа виразок у тварин при дозі іонофору 1000 мг/кг була більшою, ніж у тварин які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг: на I добу на 28% ($p < 0,05$), на III добу – на 49% ($p < 0,01$), V добу – на 40% ($p < 0,01$) і VII добу на 45% ($p < 0,01$).

Абсорбція нігрозину епітелієм тонкої кишки. Відомо, що кишковий епітелій повинен не тільки запобігати транслокації бактерій у слизову оболонку, але також обмежувати потрапляння до організму різноманітних

високомолекулярних антигенів (метаболітів бактерій, харчових алергенів тощо). Ця функція забезпечується завдяки білку оклюдину, який утворює щільні контакти між ентероцитами. При запаленні відбувається підвищення рівня експресії прозапального цитокіна IL-1 β , який впливає на функцію щільних контактів і, відповідно, викликає підвищення проникності епітеліального бар'єру кишки (ЕБК) [141]. Певний вплив на коливання рівня IL-1 β також може чинити дефіцит або надлишок цинку в організмі [58]. Також у підвищення абсорбції макромолекул клітинами ЕБК може вносити вклад зменшення рівня секреції слизу келихоподібними клітинами й безпосереднє ушкодження ентероцитів.

Оскільки збільшенням проникності ЕБК є характерною ознакою усіх ентеропатій [84], наступним етапом дослідження була оцінка бар'єрної функції кишкового епітелію за таким критерієм, як його здатність до абсорбції макромолекул вітального барвника (нігрозину), яка за нормальних умов є незначною [207]. Застосування тесту абсорбції вітального барвника (нігрозину) поверхнею кишкового епітелію (рис. 4.5) дозволило встановити наявність порушень проникності ЕБК у тварин за умов блокування ЦОГ та при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ на тлі блокування ЦОГ.

У тварин за умов блокування ЦОГ кількість абсорбованого клітинами кишкового епітелію нігрозину на I добу збільшувалась на 38% (p<0,001), а на III добу – на 16% (p<0,01) порівняно з контрольною групою. На V добу цей показник вже не відрізнявся від значень контрольних тварин, що свідчить про відновленні бар'єрної функції ЕБК.

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn²⁺ на тлі блокування ЦОГ кількість екстрагованого з кишкового епітелію нігрозину при дозі іонофору 400 мг/кг на I – VII добу дослідження була на 75% (p<0,01), 51% (p<0,01), 52% (p<0,01) і 26% (p<0,05) більше, ніж у контрольних щурів, а при дозі іонофору 1000 мг/кг, відповідно більше на 92% (p<0,01), у 2 рази (p<0,01), 2,1 рази (p<0,01) та 82% (p<0,01).

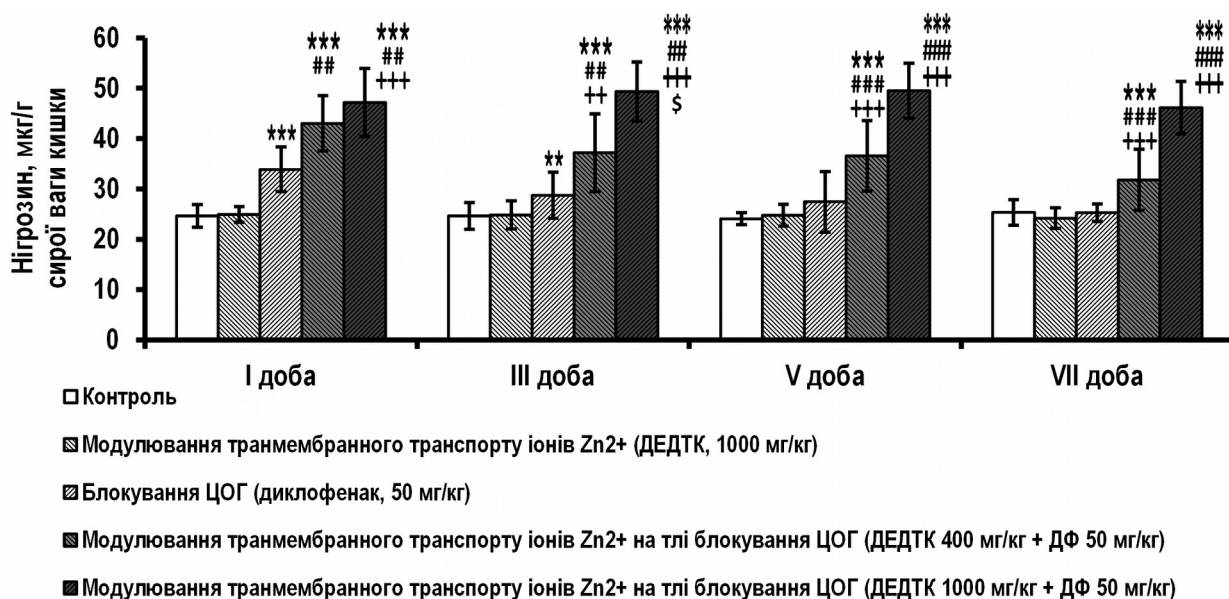


Рис. 4.5. Кількість нігрозину, абсорбованого епітелієм тонкої кишки щурів, мкг/г сухої ваги тканини кишки у I-VII добу дослідження. $M \pm SD$; $n = 5$ у кожній групі.

Кількість екстрагованого нігрозину у тварин за умов одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ була більшою, ніж у тварин, які зазнавали лише блокування ЦОГ: при дозі іонофору 400 мг/кг – на III добу на 29% ($p < 0,01$), V добу – на 33% ($p < 0,05$) та VII добу – на 25% ($p < 0,01$), а при дозі іонофору 1000 мг/кг – більшою на I добу на 39% ($p < 0,001$), на III добу на 71% ($p < 0,001$), на V добу – на 80% ($p < 0,001$) та на VII добу – на 83% ($p < 0,001$) більшою. Отже, тримані результати у тварин обох зазначених груп свідчать про більший ступінь ушкодження слизової оболонки у цих тварин, ніж у щурів за умов звичайного блокування ЦОГ.

Окрім цього на III добу дослідження було встановлено наявність статистично значущих відмінностей й поміж обома групами тварин, які зазнавали сполученого впливу модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ, оскільки кількість абсорбованого нігрозину у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг була вищою на 32% ($p < 0,05$) ніж у тварин, які отримували меншу дозу іонофору (400 мг/кг).

Отже, ступінь змін проникності ЕБК у тварин, як за умов блокування ЦОГ,

так і при поєднанні модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} із блокуванням ЦОГ, варіювала у широких межах, будучи мінімально вираженою у тварин за умов блокування ЦОГ й максимально – у тварин, які одночасно отримували іонофор та інгібітор ЦОГ. Однак, незважаючи на різну ступінь ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки ознаки її відновлення спостерігалися у тварин усіх зазначених груп, а у щурів, які зазнавали лише блокування ЦОГ до закінчення дослідження бар'єрна функція кишкового епітелію практично нормалізувалась.

Зміни морфометричних показників кишкового епітелію. Гістологічна оцінка ступеня ураження слизової оболонки тонкої кишки при її запаленні зазвичай ґрунтується на визначенні аномалій мікроархітектури кишкового епітелію (потовщення та укорочення кишкових ворсинок, ерозії їх апікальних відділів) та локальних ознак запальної реакції (лейкоцитарна інфільтрація власної пластинки кишки та епітеліальні гранулеми) [153, 161]. Тому з метою оцінки ступеня альтерації слизової оболонки тварин та визначення наявності її регенерації впродовж терміну дослідження нами було проведено загальну гістологічну оцінку тканини тонкої кишки щурів.

Морфологічні зміни ворсинок кишкового епітелію. За результатами мікроморфометричного аналізу епітелію слизової оболонки тонкої кишки було встановлено, що як звичайне блокування ЦОГ так і блокування ЦОГ у поєднанні із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} суттєво впливають на мікроструктуру слизової оболонки тварин.

У тварин за умов блокування ЦОГ відносна кількість морфологічно змінених ворсинок (рис. 4.6) на I добу дослідження перевищувала значення контрольної групи у 6,5 разів ($p < 0,001$) і втримувалась на даному рівні до III доби включно, а починаючи з V доби визначалося відновлення морфології кишкових ворсинок, оскільки в цей час перевищення показників контрольних тварин становило 1,6 рази ($p < 0,001$), а на VII добу – лише 84 % ($p < 0,05$), що свідчить про позитивну динаміку регенерації кишкового епітелію.

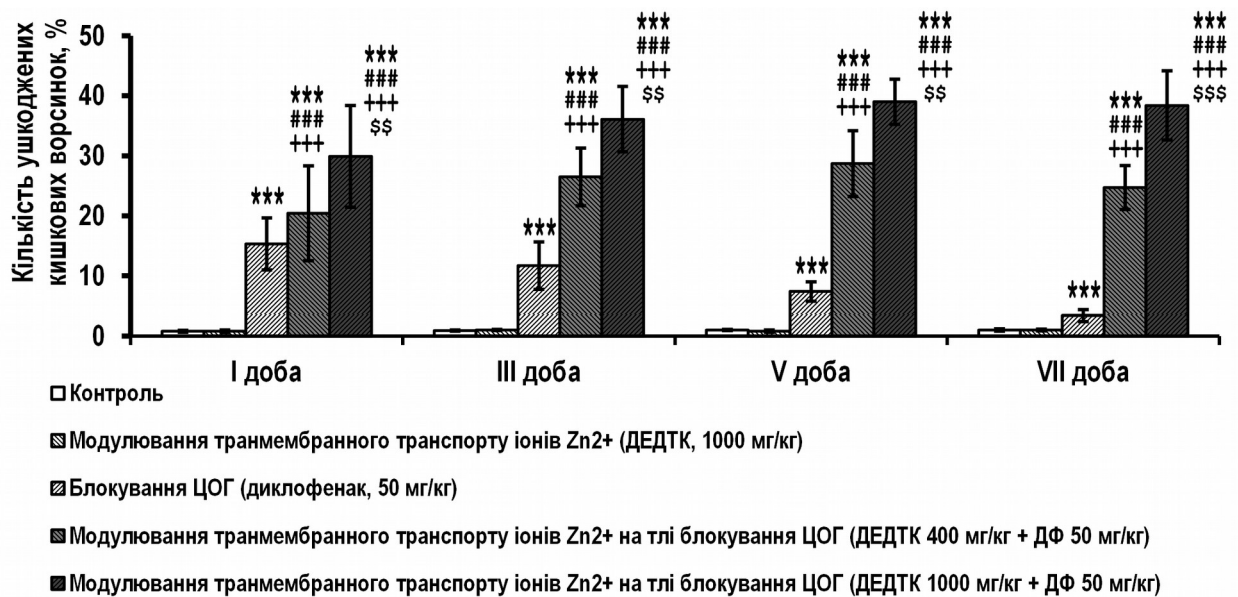


Рис. 4.6. Кількість кишкових ворсинок слизової оболонки тонкої кишки щурів з морфологічними ознаками ушкодженнями у I-VII добу дослідження. $M \pm SD$; n у кожній групі = 40.

У тварин за комбінованої дії іонофору та інгібітору ЦОГ дані зміни були, по-перше, більш виражені, а по-друге – істотного відновлення морфології ворсинок за весь строк дослідження не спостерігалось. Так, на I добу кількість морфологічно змінених ворсинок у тварин при дозі іонофору 400 мг/кг була у 8,4 рази ($p < 0,001$), а при дозі 1000 мг/кг – у 11,4 рази ($p < 0,001$) більшою ніж в контрольних тварин, на III добу – у 10 і 15 разів ($p < 0,001$) більшою, а на V-VII добу – у 11,5 та 17,5 разів ($p < 0,001$) рази відповідно.

На більшу ступень ураження епітелію тонкої кишки в щурів при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, порівняно із щурами, які отримували лише інгібітор ЦОГ вказує той факт, що впродовж усього терміну дослідження кількість морфологічно змінених ворсинок у них була більшою: на I добу при дозі іонофору 400 мг/кг на 33% (н.з.), а при дозі іонофору 1000 мг/кг – на 95% ($p < 0,01$), на III добу у 2,3 ($p < 0,001$) рази та 3,1 рази ($p < 0,001$), на V добу – у 3,9 ($p < 0,001$) рази та 5,3 рази ($p < 0,001$) та на VII добу у – 7,2 рази ($p < 0,001$) та 11,3 рази ($p < 0,001$) відповідно для зазначених доз іонофору.

Більш того, й поміж обома зазначеними групами також були виявлені статистично значущі розбіжності. Так, показник, що розглядається, у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг перевищував значення групи тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг: на I добу на 46% ($p < 0,01$), на III добу – на 36% ($p < 0,01$), на V добу – на 35% ($p < 0,01$) та на VII добу – на 55% ($p < 0,001$).

Морфометричні показники кишкових ворсинок (рис. 4.7) у тварин як за умов звичайного блокування ЦОГ, так і при одночасному блокуванні ЦОГ та модуляції трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , також характеризувалися істотними змінами. У тварин за умов блокування ЦОГ на I добу відзначалося укорочення кишкових ворсинок на 8% ($p < 0,001$) та збільшення їх ширини на 32% ($p < 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. На III добу висота ворсинок була на 9% ($p < 0,001$) менша, а ширина на 13% ($p < 0,001$) більша, ніж в контролі. На V-VII зазначені показники поступово повертались до значень контрольної групи.

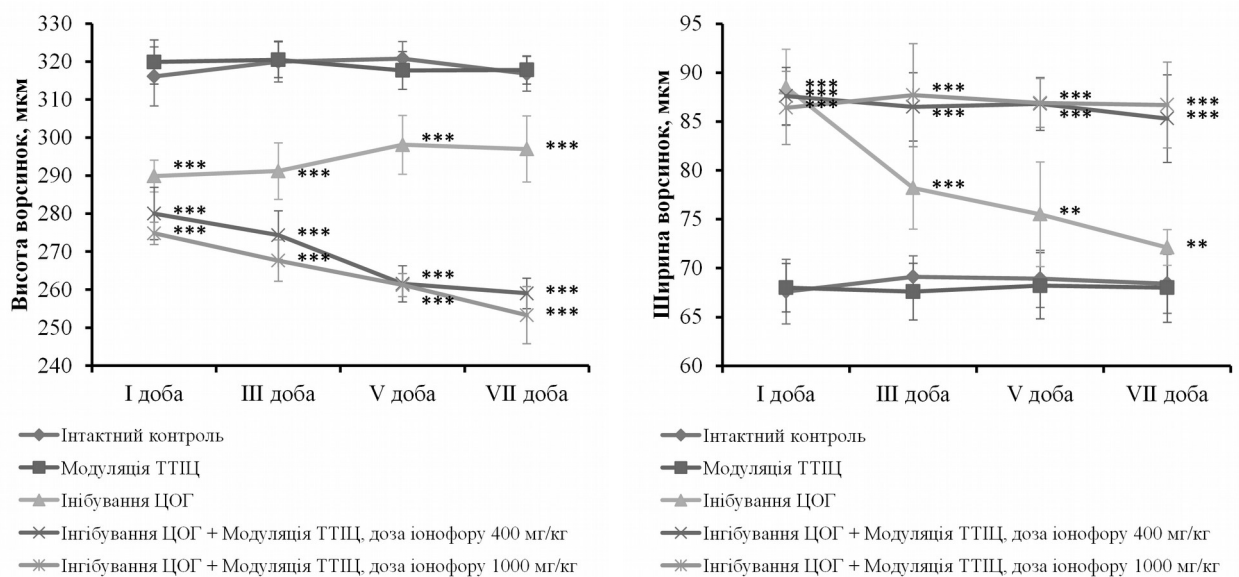


Рис. 4.7. Мікрморфометричні показники висоти (А) і ширини (Б) кишкових ворсинок слизової оболонки тонкої кишки щурів у I-VII добу дослідження ($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі).

При модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ висота ворсинок, порівняно із контрольними тваринами, прогресивно зменшувалась: на I добу на 12% ($p < 0,001$) при дозі іонофору

400 мг/кг, та на 14% ($p < 0,001$) при дозі іонофру 1000 мг/кг. На VII добу цей показник був відповідно менший на 18% і 20% ($p < 0,001$). Ширина кишкових ворсинок була більшою за значення контролю у середньому на 28% ($p < 0,001$) у тварин обох цих група і залишалась практично без змін увесь період дослідження.

Кількісні зміни келихоподібних клітин та клітин Панета епітелію тонкої кишки. За результатами оцінки на гістологічних зрізах тканини тонкої кишки середньої кількості келихоподібних клітин у кишкових ворсинках (табл. 4.4) було встановлено, що при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} у тварин протягом усього терміну дослідження змін кількості клітин обох типів не відбувалось.

Зміни кількості келихоподібних клітин, виявлені у тварин, які зазнавали блокування ЦОГ, носили характер тимчасового зниження, оскільки лише на I та III добу їхня кількість була менше показників контрольних тварин у середньому на 19% ($p < 0,01$), на V добу вже відповідала показникам контрольної групи тварин, а на VII добу навіть перевищувала їх на 23% ($p < 0,001$).

Таблиця 4.4

Кількість келихоподібних клітин у кишкових ворсинках
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Середня кількість келихоподібних клітин			
	I доба ($n = 10$)	III доба ($n = 10$)	V доба ($n = 10$)	VII доба ($n = 10$)
Контроль	18,3±2,89	17,4±1,02	16,6±2,25	18,9±1,39
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	18,3±1,43	18,2±1,69	17,5±1,83	18,4±2,19
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	14,8±2,44 **	14,1±2,54 **	16,4±1,40	23,2±2,90 ***
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	18,4±2,45 ++	13,4±2,55 ** ##	10,3±2,55 ** ### +++	9,9±1,92 *** ### +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	18,9±1,72 ++	10,3±1,81 *** ### ++ \$\$	8,7±1,71 *** ++ \$	9,0±2,52 *** ### +++

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ на III добу відбувалося зменшення кількості келихоподібних клітин: при дозі іонофору 400 мг/кг на 23% ($p < 0,01$), а при дозі іонофору 1000 мг/кг – на 41% ($p < 0,001$), на V добу зменшення кількості даних клітин у тварин зазначених груп становило відповідно 38% ($p < 0,001$) і 48% ($p < 0,001$), на VII добу 48% та 52% ($p < 0,001$). На III та V добу була встановлена розбіжність безпосередньо між тваринами обох цих груп, оскільки кількість келихоподібних клітин у цей термін у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг була відповідно менша на 23% ($p < 0,01$) та 16% ($p < 0,05$), ніж у тварин, які отримували нижчу дозу іонофору.

У цілому результати мікроморфометричного аналізу кишкового епітелію дозволили попередньо оцінити ступінь ушкодження та запалення епітелію тонкої кишки, яке було найбільш вираженим у тварин, які зазнавали одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ.

Порушення функції кишкового бар'єру є важливою ланкою у патогенезі ентериту будь якого походження [93]. За нормальних умов потрапляння бактерій у власну пластинку кишки обмежено по-перше слизовим шаром, а по-друге щільними контактами ентероцитів [105]. Бактерії, які досягли поверхні ворсинок, поглинаються антиген-презентуючими дендритними клітинами і лише таким чином потрапляють до власної пластинки кишки. При порушенні секреції слизу, ерозії та десквамації епітелію слизової оболонки здатність бактерій потрапляти у власну пластинку кишки значно підвищується, що призводить до активної міграції до ділянок ураження нейтрофілів, та відповідно гіперактивації неспецифічної імунної відповіді та ще більшого ураження тканини кишки [76]. Подібні зміни спостерігались у нашому дослідженні у тварин, які зазнавали звичайного блокування ЦОГ у ранній термін дослідження, та у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ – впродовж усього дослідження. Однак у тварин за монофакторної дії інгібітору ЦОГ спостерігалась позитивна динаміка репарації

ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки. Збільшення кількості келихоподібних клітин і клітин Панета у тварин цієї групи у більш пізній строк дослідження на нашу думку можна віднести до ознак адаптації кишкового епітелію до умов підвищеного бактеріального навантаження [303].

Отримані результати наочно демонструють, що максимальний ступінь ураження слизової оболонки тонкої кишки спостерігався у тварин, які одночасно зазнавали впливу блокування ЦОГ та модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} . Згідно до теорії “потрійного ураження” або “tree hit theory” (I. Vjarnason et al., 1993) першим етапом в ураженні слизової оболонки тонкої кишки є місцевий (локальний) ефект, який визначається як ЦОГ-незалежний вплив, спричинений прямим контактом кишкового епітелію із метаболітами НПЗП, присутніми у порожнині кишки. Даний ефект виникає внаслідок фармакогенетичного перетворення, подальшої гепатобіліарної екскреції та транспортування глюкуронізованого у печінці НПЗП або його окиснених метаболітів до порожнини дистального відділу тонкої кишки, де під дією бактеріальної β -глюкоронідази продукуються аглікони. Вільні аглікони розчиняють фосфоліпиди мембран ентероцитів, і потрапивши до клітин метаболізуються далі цитохромом P450s у реакційноздатні метаболіти. Ці процеси призводять до прямого ушкодження мітохондрій та ендоплазматичної сітки. Ушкодження мітохондрій виснажує енергетичні резерви клітин і призводить до витоку кальцію та продукування вільних радикалів; при цьому відбувається руйнування міжклітинних контактів і проникність слизової оболонки тонкої кишки збільшується. Через порушений епітеліальний бар’єр у ентероцити вільно потрапляють жовчні кислоти, протеолітичні ферменти, кишкові бактерії та токсини, що у наслідку викликає ураження слизової оболонки [84]. Місцевий ефект відіграє ключову роль не тільки при пероральному прийомі НПВП, а й при будь-якому типі парентерального уведення внаслідок гепатобіліарної екскреції метаболітів НПВП та кишково-печінкової циркуляції [84, 85, 335, 333].

Як вже вказувалось раніше Грам-негативна мікрофлора, а точніше бактеріальна β -глюкоронідаза, яка синтезується ентеробактеріями, відіграє одну з

ключових ролей у первинному ураженні слизової оболонки. Дійсно, як було показано K.S. Saitta et al. (2014) блокування бактеріальної β -глюкоронідази захищає мишей від уражень слизової оболонки тонкої кишки за дії індометацину, кетопрофену та диклофенаку [68]. Нагадаємо, що зростання кількості кишкової палички у тварин які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі інгібування ЦОГ та порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, становило 1,5 рази (при дозі іонофору 400 мг/кг), та 4,5 рази – у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг. Тому на нашу думку правомірним є припущення про те, що збільшення кількості ентеробактерій за умов сукупного впливу інгібітору ЦОГ та іонофору призводило до більш ефективного метаболічного перетворення глюкоронізованих метаболітів НПВП у цитотоксичні вільні аглікони у одиницю часу, і, як наслідок цього, викликало більш тяжкі ураження слизової оболонки тонкої кишки у щурів зазначених груп.

Стосовно ЦОГ-опосередкованого впливу інгібіторів ЦОГ на стан слизової оболонки ШКТ зазначимо, що пригнічення синтезу простагландинів (ПГ) не завжди супроводжується утворенням виразок. S.G. Langenbach et al. (1994) показали, що у гомозиготних мишей із нокаутом гену *COX-1* не відбувається утворення виразок у шлунку, хоча рівень ПГЕ2 в них не перевищував 1% від рівня мишей дикого типу. Більш того, уведення індометацину даним мишам призводило до значно менше вираженого виразкоутворення, ніж у мишей дикого типу [277]. З іншого боку у цілому ряді досліджень показано, що екзогенні ПГ здатні зменшувати ступінь ушкодження слизової оболонки тонкої кишки, які виникають внаслідок дії неселективних інгібіторів ЦОГ. Vjarnason et al. (1993) показали, що уведення синтетичного аналогу ПГЕ1 (мізопростолу) суттєво відновлює порушену внаслідок дії НПЗП проникність кишкового епітелію [304]. Fujimori et al. (2009) отримали подібні результати про те, що одночасне прийняття мізопростолу зменшує частоту утворення ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки при 2-х тижневому курсі прийому диклофенака натрію (25 мг, тричі в день) у здорових волонтерів [274]. Таким чином пригнічення синтезу ПГ, як прямий наслідок дії інгібіторів ЦОГ, сприяє

виникненню ушкодженню слизової оболонки тонкої кишки, оскільки ПГ забезпечують резистентність епітелію до впливу несприятливих факторів кишкового вмісту та підтримують його високу проліферативну активність [333].

На цьому етапі дослідження виникає питання про те, чи можна пояснити значно більшу ступінь ураження слизової оболонки тонкої кишки щурів при блокуванні ЦОГ на тлі модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} порівняно із тваринам, які зазнавали лише блокування ЦОГ тільки збільшенням кількості ентеробактерій? Оскільки іони цинку Zn^{2+} є потужним протизапальним агентом, а збільшення рівня синтезу ПГ є одним з механізмів розвитку запальної відповіді виникає наступне питання – чи впливають іони даного МЕ на синтез ПГ?

Відомо, що ряд дивалентних катіонів (Au^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) пригнічують синтез ПГ [191]. С.А. Marpes et al. (1978) показали, що цинк у концентрації 2 ммоль призводить до повного пригнічення синтезу ПГ у активованих нейтрофілах, виділених з очеревиного ексудату щурів [181]. Введення цинк-дефіцитним щурам із карциномою язика сульфату цинку зменшує активність ЦОГ-2 втричі впродовж декількох годин [341]. Y.H. Chen et al. (2012) показали, що пероральний прийом цинку зменшує більш ніж у два рази активність ЦОГ-2 у плаценті мишей при уведенні ліпополісахариду [346]. Таким чином дані літератури свідчать про те, що іони Zn^{2+} мало впливають на активність ЦОГ-1, проте знижують активність ЦОГ-2. На відміну від ЦОГ-1, експресія якої відбувається конститутивно, експресія ЦОГ-2 у більшості клітин ссавців є індукованим дією цитокинів, факторів росту, бактеріальних ендотоксинів процесом [308, 329]. Окрім прозапальної дії ЦОГ-2 має протизапальні властивості. Наприклад D.W. Gilroy et al. (1999) показали, що у щурів із індукованим каррагеніном плевритом, максимальна експресія ЦОГ-2 спостерігалась через 2 години, що у свою чергу спричиняло максимальний рівень синтезу ПГЕ2 і підсилення запалення. Однак надалі відбувалось повторне підвищення експресії ЦОГ-2, яке призводило до зниження синтезу ПГЕ2 та збільшення рівня синтезу ПГД2 і ПГЖ2 і, відповідно, зменшення запальної відповіді. Інгібітори ЦОГ змінюють подібну тенденцію, тимчасово пригнічуючи

запалення на його ранній стадії, але призводять до значного підсилення запальної відповіді пізніше [184]. Ознаки подібної динаміки спостерігались і у нашому дослідженні.

Тому спираючись на дані літератури можна припустити, що більш виражений ступень ушкодження слизової оболонки тонкої кишки, який був визначений у щурів за умов одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ, у тому числі може бути пов'язаний з пригніченням експресії ЦОГ-2 іонами Zn^{2+} і, відповідно, більш значним зменшенням синтезу простагландинів, ніж у тварин за звичайної дії неселективного інгібітору ЦОГ.

4.4 Показники стану оксидантно-антиоксидантної системи слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Другою стадією ушкодження кишки при дії інгібіторів ЦОГ є запальна відповідь [85]. Вона індукується безпосередньо бактеріями та бактеріальними прозапальними медіаторам, які потрапляють у тканину кишки крізь ушкоджений епітеліальний бар'єр. Внаслідок цього активуються TLR сигнальні шляхи і нейтрофіли мігрують до ділянок ураження. При введенні індометацина нейтрофільна інфільтрація тканини кишки спостерігається вже через 6 годин після введення препарату [252, 244]. Нітрогену оксид, який утворюється завдяки збільшенню експресії індукібельної синтази нітрогену, стимулює продукування ФНП- α у тканині кишки, що також сприяє нейтрофільній інфільтрації ділянок ураження. Рекрутмент нейтрофілів та активація ключового транскрипційного сигнального шляху NF κ B збільшує експресію генів прозапальних цитокинів (ІЛ-6, ІЛ-8 ІЛ-1 β , ІЛ-10, ФНП- α) [315, 87]. Усі ці події є класичною запальною відповіддю, до якої залучені переважно клітини неспецифічної ланки імунної системи [230]. Велика кількість результатів досліджень вказує на те, що саме

нейтрофіли відіграють ключову роль у підсиленні процесів ураження слизової оболонки [252, 230]. Одним з головних чинників, завдяки якому нейтрофіли ушкоджують тканину кишки є окиснювальний вибух [230]. Причому має суттєве значення і той факт, що утворення АФК та АФА у тканині кишки у перші години після початку активації неспецифічного антимікробного захисту відбувається не за рахунок нейтрофілів і макрофагів, а безпосередньо клітинами кишкового епітелію, які здатні генерувати значні кількості окиснювачів при стимуляції бактеріальними антигенами [247, 203, 216]. Враховуючи вкрай виражені агресивні хімічні властивості даних сполук, поряд з антимікробною дією цілком можливе ушкодження структур клітин, у першу мембран, окиснення ліпідів яких призводить до утворення гідроперекисів, а також мембран мітохондрій, при ушкодженні яких запускається каскад реакцій, які призводять до процесу індукції апоптозу [103].

Оскільки при НПЗП-індукованій ентеропатії, яка супроводжується запаленням, також спостерігається гіперпродукція активних форм кисню (АФК) і азоту (АФА), спрямована в першу чергу проти дії патогенних бактерій [44], наступний етапом дослідження полягав у визначенні впливу модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на статус антиоксидантної системи тонкої кишки за умов блокування ЦОГ.

4.4.1 Прооксидантна активність слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Ступень лейкоцитарної інфільтрації слизової оболонки тонкої кишки. Основними постачальниками окиснювачів (АФК, АФА та мієлопероксидази) при тривалій запальній відповіді є фагоцити, тому перед викладенням результатів біохімічного дослідження активності прооксидантів у тканині кишки ми вважаємо доцільним навести результати мікроскопічної оцінки ступеня її лейкоцитарної

інфільтрації. Результати підрахунку кількості лейкоцитів у тканини дистального відділу тонкої кишки (табл. 4.5) дозволили встановити, що між контрольними щурами та тваринами, які зазнавали впливу модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , відсутні будь-які статистично значущі відмінності.

Таблиця 4.5

Лейкоцитарна інфільтрація слизової оболонки тонкої кишки щурів
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Кількість лейкоцитів у полі зору			
	I доба (n = 10)	III доба (n = 10)	V доба (n = 10)	VII доба (n = 10)
Контроль	7,7±1,55	7,8±1,17	7,7±1,86	7,8±1,82
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	7,9±1,51	8,4±1,59	8,3±1,33	8,5±0,97
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	17,4±2,40 ***	14,4±1,77 ***	9,7±1,31 **	8,1±1,36
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	10,8±2,12 ** ## +	25,8±2,68 *** ### + + +	27,8±4,15 *** ### + + +	23,2±3,57 *** ### + + +
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	9,2±1,82 ** ### + + +	33,7±4,72 *** ### + + + \$\$	39,1±3,61 *** ### + + + \$\$	34,9±4,90 *** ### + + + \$\$\$

У тварин при блокуванні ЦОГ максимальна кількість лейкоцитів у тканині тонкої кишки спостерігалася на I добу – у 2,2 рази більше ($p < 0,001$), ніж у контрольних щурів. Починаючи з III і до V доби включно відбувалося поступове зменшення цього показника. У дані часові інтервали кількість лейкоцитів була відповідно більшою на 85% ($p < 0,001$) і на 26% ($p < 0,05$) порівняно з контролем, а на VII добу вже не відрізнялась від них.

Інша динаміка спостерігалася у тварин при одночасному модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та інгібуванні ЦОГ. Першою відмінністю було те, що на I добу не відбувалося такої вираженої, як за умов звичайного блокування ЦОГ, лейкоцитарної інфільтрації тканини кишки, оскільки кількість

лейкоцитів у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг перевищувала показники контрольних щурів на 39% ($p < 0,05$), а у тварин які отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) – лише на 20% ($p < 0,05$). Друга відмінність полягла у тому, що починаючи з III доби у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ було виявлено суттєве збільшення кількості лейкоцитів у тканині тонкої кишки: на III добу цей показник перевищував значення контрольної групи у 2,3 рази ($p < 0,001$) при дозі іонофору 400 мг/кг, а при збільшенні дози іонофору до 1000 мг/кг – у 3,3 рази ($p < 0,001$). На V добу значення цього показника для обох цих груп перевищували показники контрольної групи відповідно у 2,6 рази ($p < 0,001$) та 4 рази ($p < 0,001$), і на VII добу – 1,9 ($p < 0,001$) та 3,5 ($p < 0,001$) рази відповідно.

Порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, кількість лейкоцитів у тканині кишки щурів при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ на I добу дослідження була меншою на 38% ($p < 0,05$) при дозі іонофору 400 мг/кг, та на 48% ($p < 0,001$) меншою, при дозі іонофору 1000 мг/кг, проте у наступний термін, навпаки, перевищувала показники тварин, які зазнавали лише блокування ЦОГ: на III добу на 79% ($p < 0,001$) у тварин, які отримували іонофору у дозі 400 мг/кг, та у 2,3 рази ($p < 0,001$) – при збільшенні дози іонофору до 1000 мг/кг. На V та VII добу показник, що розглядається у зазначених групах тварин був у середньому більшим відповідно у 2,7 ($p < 0,001$) та у 4,1 рази ($p < 0,001$) ніж у контролі. Аналіз статистичних розбіжностей між обома групами тварин, які одночасно зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ показав, що на I добу кількість лейкоцитів у тканині дистального відділу тонкої кишки тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг була меншою на 15% ($p < 0,05$) за показники тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг, а у подальший термін навпаки, перевищувала їх: на III добу на 31% ($p < 0,01$), на V добу – на 41 % ($p < 0,01$) та на VII добу – на 50% ($p < 0,001$).

Вище було зазначено, що лейкоцитарна інфільтрація тканини кишки, ознаки якої спостерігаються вже через 6 годин після уведення неселективних інгібіторів ЦОГ, є характерною для НПВП-індукованого ушкодження слизової оболонки тонкої кишки. За даними Т. Yamada et al. (1993) одноразове підшкірне уведення індометацину (7,5 мг/кг) призводить до ураження дистальної частини тонкої кишки максимум якого спостерігається впродовж 3-х діб після уведення препарату, а повне відновлення епітелію кишки відбувається впродовж одного тижня; подібні результати для індукованого індометацином ушкодження тканини тонкої кишки наведені і у роботі M.J. Derelanko (1980) [229, 124]. Подібні результати отримані і у нашому дослідженні у тварин, які зазнавали блокування ЦОГ. Однак звертає на себе увагу той факт, що поєднання блокування ЦОГ із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} призводило до значно меншої лейкоцитарної інфільтрації тканини кишки на I добу дослідження, хоча ступінь ушкодження слизової оболонки у даних тварин була найбільшою. Даний стан на нашу думку може бути пов'язаний із пригнічувальною дією іонофору на розвиток місцевої запальної відповіді. Це може бути обумовлено як значним та тривалим зниженням синтезу ПГ у кишці даних тварин, оскільки ПГ сприяють рекрутменту нейтрофілів до ділянок запалення, а також попущенням NF κ B сигнального шляху внаслідок високої концентрації іонів Zn^{2+} у тканині кишки цих тварин. Однак у подальший термін дослідження лейкоцитарна інфільтрація у даних тварин досягала максимальних значень серед усіх досліджених груп, і втримувалася на такому рівні до VII доби дослідження. Вірогідно, що порушена на початку дослідження антибактеріальна відповідь сприяла виникненню суттєвих дисбіотичних змін пристінної мікрофлори тонкої кишки, що у подальшому призводило до гіперактивації неспецифічного імунного захисту її слизовій оболонки.

Для більш точної оцінки ступеня запалення тканини тонкої кишки та рівня її оксидативного ушкодження нами було проведено визначення стандартних біохімічних маркерів запалення – активності мієлопероксидази (МПО),

концентрації нітритів та гідропероксидів ліпідів у гомогенатах слизової оболонки тонкої кишки щурів [2, 8, 9].

Активність мієлопероксидази у слизовій оболонці тонкої кишки.

Отримані результати визначення активності МПО (табл. 4.6) у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки щурів при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , свідчать про те, що порівняно з контрольною групою активність даного ензиму знижувалась у 4,1 рази ($p < 0,001$) лише на I добу дослідження, а на III-VII добу відповідала нормі.

Таблиця 4.6

Активність мієлопероксидази у гомогенатах слизової оболонки тонкої кишки
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Активність мієлопероксидази, у.о./г сирової ваги кишки			
	I доба (n = 10)	III доба (n = 10)	V доба (n = 10)	VII доба (n = 10)
Контроль	3,3±0,28	3,4±0,50	3,0±0,70	3,1±0,60
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	0,8±0,11 ***	3,2±0,64	3,4±0,67	3,1±0,44
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	9,0±0,87 ***	7,2±0,67 ***	5,2±0,67 ***	3,6±0,52 *
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	6,5±1,29 *** #### ++	13,5±1,86 *** #### +++	12,2±1,85 *** #### +++	12,2±2,25 *** #### +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	3,9±0,64 * #### +++ \$\$\$	21,0±3,13 *** #### +++ \$\$\$	19,4±2,18 *** #### +++ \$\$\$	18,4±3,63 *** #### +++ \$\$\$

У щурів при блокуванні ЦОГ на I добу дослідження відбувалося збільшення активності МПО у 2,7 рази ($p < 0,001$) порівняно з контрольними тваринами. У наступний термін спостерігалось поступове зниження активності цього ензиму: на III добу активність МПО була більша у 2,1 рази ($p < 0,001$), на V добу – на 73% ($p < 0,001$), а на VII – лише на 18,6% ($p < 0,05$) більше, ніж у контролі.

Більш виражені зміни спостерігалися у щурів при одночасному модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокуванні ЦОГ, причому максимум

активності МПО був визначений лише починаючи з III доби. Так, у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг активність МПО перевищувала значення контрольних тварин на I добу на 96% ($p < 0,001$), на III – VII добу – у середньому у 3,9 рази ($p < 0,001$). У тварин, які отримували іонофор у більшій дозі (1000 мг/кг) активність МПО перевищувала показники контрольної групи на I добу на 15% ($p < 0,05$), а на III – VII добу – у середньому у 6,3 рази ($p < 0,001$).

Порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, активність МПО у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ на I добу дослідження при дозі іонофору 400 мг/кг була менше на 28% ($p < 0,001$), а при дозі іонофору 1000 мг/кг – у 2,3 рази ($p < 0,001$) меншою. Однак у наступний період (на III – VII добу) активність даного ензиму в тварин які зазнавали одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ зростала, і суттєво перевищувала показники тварин, які зазнавали лише блокування ЦОГ: на III добу на 87% ($p < 0,001$) і у 2,9 рази ($p < 0,001$) при дозі іонофору 400 мг/кг та 1000 мг/кг відповідно; на V добу зазначений показник, у залежності від дози іонофору, був більшим у 2,3 ($p < 0,001$) та 3,7 рази ($p < 0,001$), на VII добу у 3,4 ($p < 0,001$) та 5,1 ($p < 0,001$) рази більше.

При порівнянні значень активності МПО у тварин, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, було встановлено, що у щурів, які отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) активність цього ензиму була на I добу нижчою на 66% ($p < 0,001$), ніж у тварин, які отримували меншу дозу іонофору (400 мг/кг), а на III – VII добу, навпаки, була вище у середньому на 55% ($p < 0,001$).

Отримані результати дослідження активності МПО у тварин у цілому узгоджуються із відомим фактом, що запалення кишки завжди характеризується високими рівнями даного ензиму. Активність та рівень експресії МПО у хворих на ЗХК більші у ділянках запалення, ніж у неушкоджених ділянках кишки або у здорових людей [179]. Концентрація МПО у промивній рідині порожнини товстої кишки у хворих на ЗХК, визначена за допомогою імуноферментного аналізу, є збільшеною від 2-х до 18-ти разів, порівняно із здоровими людьми [245].

Ці результати підтверджуються й підвищеним рівнем МПО у фекаліях пацієнтів з хворобою Крона та виразковим колітом. Рівень фекальної МПО у хворих на виразковий коліт добре корелює із ступенем ураження кишки, визначеного за даними ендоскопічного дослідження [51]. W.B. Song et al. (2010) наводять результати про те, що активність МПО у тканині кишки при індукованому уведенням метотрексата ентериті збільшується майже у 4 рази [157].

Визначений факт зниження активності МПО на I добу дослідження у тварин, як за модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , так і при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, узгоджується з даними роботи Izumi Y. et al. (1994) якими було показано, що ДЕДТК інгібує активність МПО нейтрофілів [133]. Тому, з огляду на отримані нами результати та дані літератури, можна стверджувати, що введення іонофору за умов блокування ЦОГ призводить до зниження активності місцевої запальної відповіді у тому числі й шляхом зменшення активності МПО нейтрофілів, присутніх у тканині кишки. Окрім цього, вміст МПО у слизовій оболонці кишки прямо залежить від інфільтрації його тканини фагоцитами, яка у тварин, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, на I добу дослідження була менша, ніж у тварин, які зазнавали лише блокування ЦОГ. Але у подальший термін активність МПО у слизовій оболонці тонкої кишки тварин, які зазнавали одночасного із блокування ЦОГ модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} суттєво зростала і втримувалась на високому рівні до закінчення дослідження. Враховуючи вкрай агресивні властивості гіпохлориту, який продукує МПО, по відношенню до клітин, не можна виключити можливість того, що така тривала активація, яка спостерігалась у цих щурів, була однією з причин більш виражених та тривалих ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки.

Концентрація нітритів у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки. При визначенні концентрації нітритів у тканині тонкої кишки щурів (табл. 4.7) було встановлено, що даний показник у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} лише на I добу дослідження був на 17%

($p < 0,05$) меншим, ніж у контрольній групі. Однак надалі (на III – VII добу дослідження) суттєвих відмінностей між вказаними групами виявлено не було.

У тварин за умов блокування ЦОГ максимальне підвищення концентрації нітритів у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки визначалося на I добу (у 2,2 рази більше ніж в контролі, $p < 0,001$). На III добу цей показник був більше на 82% ($p < 0,001$), на V добу – на 36% ($p < 0,001$) і на VII добу – на 30% ($p < 0,05$) більше, ніж в контрольних щурів, тобто спостерігалось поступове зменшення концентрації нітритів у слизовій оболонці тонкої кишки.

Таблиця 4.7

Концентрація нітритів у гомогенатах слизової оболонки тонкої кишки щурів
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Концентрація нітритів, нмоль/г сирової ваги кишки			
	I доба ($n = 10$)	III доба ($n = 10$)	V доба ($n = 10$)	VII доба ($n = 10$)
Контроль	13,8±1,33	14,4±2,15	13,7±2,48	12,9±1,27
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	11,5±1,02 **	13,5±1,76	13,3±2,51	13,3±1,62
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	29,8±2,29 ***	26,1±3,96 ***	18,5±2,51 ***	14,8±2,03 *
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	21,8±2,48 *** ### +++	50,5±2,34 *** ### +++	51,6±2,84 *** ### +++	51,1±2,18 *** ### +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	15,1±2,54 ## +++ \$\$\$	60,0±4,24 *** ### +++ \$\$\$	62,0±5,49 *** ### +++ \$\$\$	59,3±4,28 *** ### +++ \$\$\$

У тварин при поєднанні модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} із блокуванням ЦОГ було визначено значно більш виражене підвищення концентрації нітритів у слизовій оболонці тонкої кишки лише на III – VII добу дослідження; на I добу цей показник у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг перевищував значення контролю лише на 58% ($p < 0,001$), а у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг – усього на 9% ($p > 0,05$). На III добу

спостерігалось суттєве збільшення концентрації нітритів у слизовій оболонці тонкої кишки (у 3,7 рази ($p < 0,001$) при дозі іонофору 400 мг/кг та у 4,3 рази ($p < 0,001$) – при дозі іонофору 1000 мг/кг), яке втримувалось на такому високому рівні до VII доби дослідження.

Порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, концентрація нітритів у слизовій оболонці тонкої кишки щурів, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, на I добу дослідження була менше на 10% ($p < 0,01$) при дозі іонофору 400 мг/кг, а при збільшенні дози іонофору до 1000 мг/кг – на 27% ($p < 0,001$) менше. На III добу даний показник навпаки, відповідно до зазначених доз іонофору був більшим на 93% ($p < 0,001$) та у 2,3 рази ($p < 0,001$), на V добу – у 2,8 ($p < 0,001$) та 3,4 рази ($p < 0,001$) і на VII добу – у 3,5 ($p < 0,001$) і 4,0 ($p < 0,001$) рази більше, ніж у тварин за звичайного блокування ЦОГ.

При порівнянні відмінностей між обома групами тварин, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ було встановлено, що цей показник у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг на I добу був менше на 41% ($p < 0,001$) ніж у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг, а на III – VII добу, навпаки більший на 18-20% ($p < 0,001$).

Результати великої кількості досліджень свідчать про те, що при запаленні відбувається значне та тривале збільшення рівня синтезу оксиду азоту у тканинах [9, 15] що узгоджується із отриманими нами результатами. Так, наприклад R.C. Sudarshan et al. (2014) показали, що запалення слизової оболонки внаслідок уведення цитостатичного препарату (епотозиду) призводить до збільшення рівня нітритів у тканині кишки щурів на III добу дослідження більш ніж у 2,5 рази [175].

Відомо, що нітрогену оксид виконує багато фізіологічних функцій у ШКТ (приймає участь у передачі нервових імпульсів, сприяє розслабленню гладенької мускулатури, регулює кишкову секрецію та кровообіг у тканині кишки, виступає як прозапальний медіатор), а також є важливим компонентом місцевого антибактеріального захисту слизової оболонки тонкої кишки [248]. Однак

збільшений рівень нітрогену оксиду азоту може призводити до утворення його токсичних метаболітів і ушкодження клітин [9].

Результати нашого дослідження показали, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} призводило лише до тимчасового зниження синтезу оксиду азоту, на що вказує зниження концентрації його основних метаболітів (нітритів) у слизовій оболонці кишки тварин на I добу дослідження. Подібні результати були отримані Y. Izumi et al. (1994) які показали, що ДЕДТК пригнічує активність індукцібельної синтази азоту (iNOS) у активованих макрофагах [133]. Саме тому, на відміну від тварин, які зазнавали лише блокування ЦОГ, у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ на самому початку запальної відповіді у слизовій оболонці тонкої кишки порушувався один з важливих механізмів її місцевого антибактеріального захисту – збільшення рівня продукування нітрогену оксиду, що могло сприяти неконтрольованому збільшенню бактерій-коменсалів та умовно-патогенної мікрофлори. Проте у наступний термін дослідження (на III – VII добу) у слизовій оболонці тонкої кишки щурів, які зазнавали одночасного із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} блокування ЦОГ навпаки, визначався високий рівень синтезу нітрогену оксиду, про що свідчить зростання концентрації нітритів. Це знов таки свідчить про тривалий запальний процес у її слизовій оболонці тонкої кишки цих щурів, і також може бути віднесено до факторів, які обумовлюють найбільший ступінь уражень слизової оболонки у цих тварин. Подібний стан може бути пояснений у тому числі й вираженою лейкоцитарною інфільтрацією, оскільки макрофаги, які мігрують до ділянок запалення роблять суттєвий внесок у збільшення концентрації АФА у тканині.

Оцінка ступеня оксидативного ушкодження тканини кишки за рівнем гідропероксидів ліпідів. Збільшення активності процесів ліпопексоксидації, і, відповідно, збільшення концентрації ліпопероксидів є характерною ознакою багатьох захворювань [166, 94]. На даний час утворення пероксидів ліпідів внаслідок реакції вільних радикалів з ліпідами клітин є визнаним механізмом ушкодження клітин та тканин організму. Окрім того, що гідропероксиди ліпідів

(ГПЛ) є маркерами оксидативного ушкодження клітин, вони також є і прооксидантами, здатними до подальшого ушкодження тканин, і тому для їх знешкодження потребуються ресурси антиоксидантних систем організму [306]. Збільшення рівня пероксидації ліпідів є характерним для станів, які супроводжуються утворенням великих кількостей АФК, зокрема при запальній реакції [190].

Підвищена концентрація ГПЛ у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки була визначена нами у тварин усіх груп (рис. 4.8), однак виразність і динаміка змін даного показника суттєво різнилися. Найменш вираженими та тривалими ці зміни були в щурів при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , оскільки лише на I добу в них відзначалося збільшення концентрації ГПЛ у тканині тонкої кишки на 52% ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

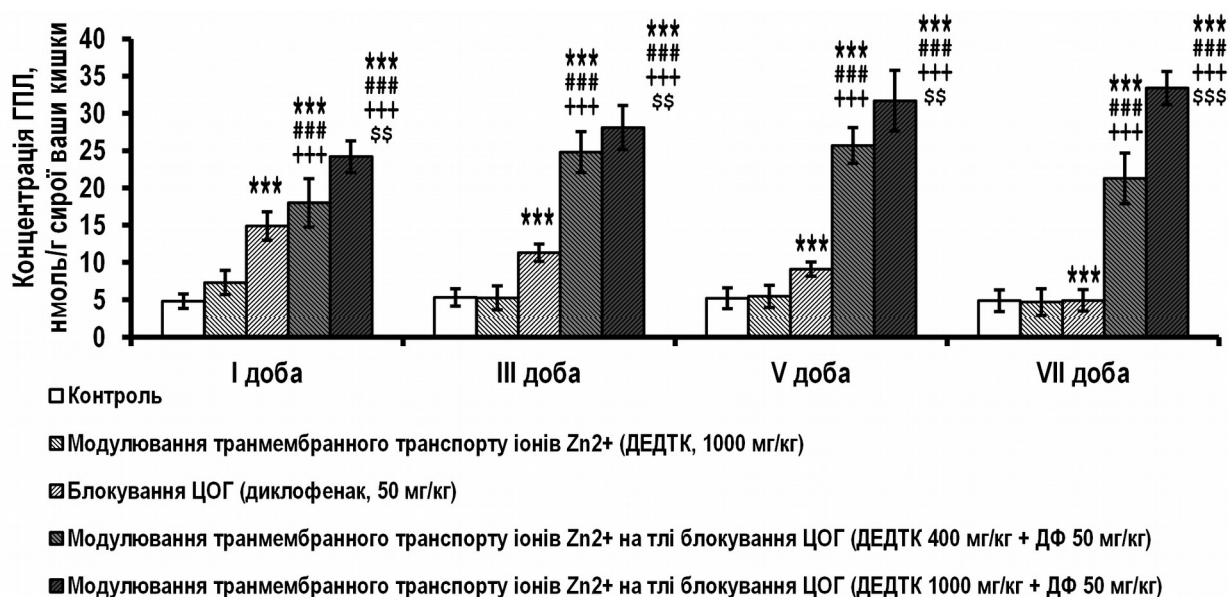


Рис. 4.8. Концентрація гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) у слизовій оболонці тонкої кишки щурів, нмоль/г сирої ваги кишки на I – VII добу дослідження ($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі).

За умов блокування ЦОГ у тварин максимальне підвищення концентрація ГПЛ у слизовій оболонці тонкої кишки спостерігалось на I добу, перевищуючи показники контрольних тварин у 3 рази ($p < 0,001$). Починаючи із III доби концентрація ГПЛ у слизовій оболонці кишки щурів цієї групи поступово

знижувалась: на III добу цей показник був у більше у 1,1 рази ($p < 0,001$), на V добу – на 75% ($p < 0,001$) більше ніж у контрольній групі, а на VII добу вже не відрізнявся від них.

У тварин, які одночасно зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ, також визначалася підвищена концентрація ГПЛ у слизовій оболонці тонкої кишки на I добу дослідження. Цей показник у залежності від дози іонофору (400 мг/кг або 1000 мг/кг) перевищував значення контрольної групи відповідно у 3,7 разу ($p < 0,001$) і 5 разів ($p < 0,001$). Надалі підвищений рівень ГПЛ зберігався до V доби включно: на III добу концентрація ГПЛ була більша у 4,7 рази ($p < 0,001$) та у 5,3 рази ($p < 0,001$), на V добу – у 4,9 ($p < 0,001$) і 6 разів ($p < 0,001$) відповідно для зазначених доз іонофору. На VII добу спостерігалось деяке зниження концентрації ГПЛ у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг, оскільки показник, що розглядається, у цей термін у них перевищував значення контрольної групи у 4,3 рази ($p < 0,001$), а у тварин, які отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) – залишався на попередньому високому рівні.

У щурів, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ, концентрація ГПЛ у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки у залежності від дози іонофору (400 мг/кг або 1000 мг/кг) була більше: на I добу на 21% ($p < 0,05$) і 63% ($p < 0,001$), на III добу – у 2,2 рази ($p < 0,001$) та 2,5 рази ($p < 0,001$), на V добу – у 2,8 рази ($p < 0,001$) та 3,5 рази ($p < 0,001$) і на VII добу – у 4,4 рази ($p < 0,001$) рази та 6,9 разів ($p < 0,001$) більшою. Більш того, порівняльний аналіз цього показника поміж обох груп тварин, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ, дозволив встановити, що концентрація ГПЛ у слизовій оболонці тонкої кишки у тварин при дозі іонофору 1000 мг/кг впродовж усього терміну дослідження була більшою, ніж у тварин, які отримували іонофор у дозі

400 мг/кг: на I добу на 34% ($p < 0,001$), на III добу – на 13% ($p < 0,05$), на V добу – на 23% ($p < 0,01$) та на VII добу – на 56% ($p < 0,001$).

Отримані результати визначення ГПЛ у слизовій оболонці тонкої кишки вказують на збільшення рівня продукування оксидантів на ранніх строках дослідження у всіх групах тварин, окрім контрольної, що є характерною ознакою запальної реакції [28]. V. Stojiljković et al. (2009) встановили, що у дітей із гострою формою целиакії (глютеніна ентеропатія, одна з форм харчової алергії) концентрація ГПЛ у тканині тонкої кишки збільшується у 1,7 рази, а при хронічній формі – майже у 3 рази [64]. Виявлене у нашому дослідженні підвищення концентрації ГПЛ у слизовій оболонці тонкої кишки може бути обумовлено у першу чергу активацією механізмів місцевого неспецифічного антибактеріального захисту у відповідь на дисбаланс пристінної мікрофлори дистального відділу тонкої кишки, яка була наявна у даний часовий інтервал у всіх групах щурів. Однак, як у тварин, які зазнавали лише модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , так і у тварин, які зазнавали тільки блокування ЦОГ, концентрація ГПЛ впродовж терміну дослідження поступово нормалізувалась. Комбіноване із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} блокування ЦОГ призводило до значно більшого та тривалого оксидативного ушкодження клітин, що підтверджує факт значного підсилення синтезу прооксидантів у слизовій оболонці тонкої кишки цих тварин впродовж усього терміну дослідження.

4.4.2 Стан антиоксидантної системи слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Під час гострого запального процесу при ЗХК, лейкоцити, які у великій кількості мігрують до ушкоджених ділянок тканини, вивільняють значну кількість активних форм кисню, які окрім бактерицидної дії здатні ушкоджувати клітини організму. Для нейтралізації можливих негативних наслідків впливу АФК, слизова оболонка має потужну антиоксидантну систему [202]. Відомо, що

баланс між рівнем продукування АФК та доступними резервами антиоксидантної системи кишки при хронічному запаленні суттєво порушується [201]. Враховуючи цей факт ми провели оцінку стану антиоксидантної системи слизової оболонки тонкої кишки щурів.

Активність супероксиддисмутази у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки. Результати дослідження активності супероксиддисмутази (СОД) (табл. 4.8) дозволили встановити, що активність даного ензиму при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} порівняно із контрольною групою лише на I добу дослідження була нижче на 38% ($p < 0,001$).

Таблиця 4.8

Активність супероксиддисмутази у слизовій оболонці тонкої кишки щурів
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Активність СОД, у.о./мг протеїну			
	I доба (n = 10)	III доба (n = 10)	V доба (n = 10)	VII доба (n = 10)
Контроль	1,22 $\pm 0,149$	1,16 $\pm 0,067$	1,23 $\pm 0,175$	1,18 $\pm 0,092$
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	0,75 $\pm 0,105$ ***	1,22 $\pm 0,114$	1,23 $\pm 0,068$	1,15 $\pm 0,098$
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	0,82 $\pm 0,151$ ***	0,96 $\pm 0,111$ ***	1,01 $\pm 0,130$ ***	1,33 $\pm 0,112$ **
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	0,60 $\pm 0,085$ *** ## ++	0,63 $\pm 0,102$ *** #### +++	0,62 $\pm 0,144$ *** #### ++	0,72 $\pm 0,130$ *** #### +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	0,52 $\pm 0,063$ *** ### ++ \$	0,47 $\pm 0,106$ *** ### +++ \$\$	0,49 $\pm 0,126$ *** ### +++ \$	0,48 $\pm 0,128$ *** ### +++ \$\$

У тварин при блокуванні ЦОГ активність СОД була найнижчою на I добу (на 33% ($p < 0,001$) нижче, ніж в контролі), на III-V добу – нижче у середньому на 18% ($p < 0,001$), а на VII добу навіть перевищувала значення контрольної групи на 13% ($p < 0,01$).

Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ призводила до виражених і тривалих змін активності СОД у слизовій оболонці тонкої кишки. Так на I добу даний показник у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг був нижче у 2 рази ($p < 0,001$), а тварин, які отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) – у 2,3 рази ($p < 0,001$) нижче, ніж в контролі. На III добу активність СОД була нижчою на 84% ($p < 0,001$) та у 2,4 ($p < 0,001$) рази, на V добу – на 98% ($p < 0,001$) і 2,5 рази ($p < 0,001$) нижче і на VII добу – на 63% ($p < 0,001$) і у 2,4 ($p < 0,001$) рази нижче, відповідно до зазначених доз іонофору.

За результатами статистичного аналізу відмінностей між тваринами, які зазнавали одночасного із модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} блокування ЦОГ та тваринам, які зазнавали лише блокування ЦОГ було встановлено, що активність СОД у слизовій оболонці тонкої кишки у тварин за комбінованої дії іонофору та інгібітору ЦОГ була нижчою на I добу на 27% ($p < 0,01$) при дозі іонофору 400 мг/кг та на 37% ($p < 0,01$) – при дозі іонофору 1000 мг/кг, на III добу – на 34% ($p < 0,01$) та 52% ($p < 0,001$), на V добу – на 39% ($p < 0,01$) та 52% ($p < 0,001$) й на VII добу – на 46% ($p < 0,01$) та 64% ($p < 0,001$) ніж у тварин, які отримували лише інгібітор ЦОГ. Окрім цього було визначено, що активність СОД у тварин, які при модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг на I добу була нижчою на 14% ($p < 0,05$), на III добу – на 26% ($p < 0,01$), на V добу – на 21% ($p < 0,05$) та на VII добу – на 34% ($p < 0,05$) нижче, ніж у тварин, в яких доза іонофору, отримана разом із інгібітором ЦОГ, становила 400 мг/кг.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} при одночасному блокуванні ЦОГ призводить до більш вираженого та тривалого зниження активності СОД у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки.

Активність каталази у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки. Активність каталази (КАТ) у слизовій оболонці тонкої кишки (табл. 4.9) щурів при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} була більша за

показники контрольних щурів на 27% ($p < 0,05$) тільки на I добу дослідження, а надалі не відрізнялась від них.

При блокуванні ЦОГ активність КАТ у слизовій оболонці тонкої кишки тварин була дещо нижчою, ніж в контролі: на I добу цей показник знижувався на 21% (н.з.), на III добу – на 24% ($p < 0,01$), на V добу – на 27% (н.з.) і на сьому – на 10% (н.з.), однак ці зміни, за винятком III доби, були поза межами статистичної значущості.

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ у залежності від дози іонофору (400 мг/кг або 1000 мг/кг) на I добу спостерігалось зменшення активності КАТ на 38% ($p < 0,01$) і 55% ($p < 0,001$), на III добу – у 2 рази ($p < 0,001$) і 2,6 рази ($p < 0,001$), V добу – у 2,1 рази ($p < 0,001$) і 2,6 рази ($p < 0,001$) і на VII добу – у 2,2 ($p < 0,001$) і 3,7 рази ($p < 0,001$) відповідно.

Таблиця 4.9

Активність каталази у слизовій оболонці тонкої кишки
($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі)

Група тварин	Активність каталази, ммоль/хв/мг протеїну			
	I доба (n = 10)	III доба (n = 10)	V доба (n = 10)	VII доба (n = 10)
Контроль	0,29 $\pm 0,086$	0,31 $\pm 0,041$	0,29 $\pm 0,66$	0,33 $\pm 0,089$
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг)	0,37 $\pm 0,039$ *	0,31 $\pm 0,075$	0,31 $\pm 0,035$	0,29 $\pm 0,077$
блокування ЦОГ (диклофенак, 50 мг/кг)	0,23 $\pm 0,056$	0,24 $\pm 0,035$ **	0,21 $\pm 0,092$	0,30 $\pm 0,035$
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 400 мг/кг)	0,18 $\pm 0,039$ ** ### +	0,15 $\pm 0,050$ *** ### ++	0,14 $\pm 0,060$ *** ###+++	0,15 $\pm 0,066$ *** ## +++
Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ (диклофенак 50 мг/кг + ДЕДТК 1000 мг/кг)	0,13 $\pm 0,041$ *** ### ++	0,12 $\pm 0,057$ *** ###+++	0,11 $\pm 0,042$ *** ### +	0,09 $\pm 0,037$ *** ###+++ \$\$\$

Активність КАТ у тварин, які зазнавали модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ була нижчою не тільки за показники контрольної групи, але й за показники тварин, які зазнавали тільки блокування ЦОГ. Так, активність даного ензиму у тварин, які разом із інгібітором ЦОГ отримували іонофор у дозі 400 мг/кг на I добу була нижчою на 27% ($p < 0,05$), а у тварин, які отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) – на 78% ($p < 0,01$) нижчою ніж у тварин, які отримували лише інгібітор ЦОГ. На III добу цей показник у залежності від дози іонофору (400 мг/кг або 1000 мг/кг) був відповідно нижче на 60% ($p < 0,01$) та у 2 рази ($p < 0,001$), на V добу – у 2,1 рази ($p < 0,001$) та 2,6 рази ($p < 0,05$) і на VII добу – у 2,2 рази ($p < 0,001$) й 3,6 рази ($p < 0,001$) нижче, ніж у тварин за умов звичайного блокування ЦОГ.

Розбіжність між обома групами тварин, які одночасно із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} зазнали блокування ЦОГ була встановлена лише на VII добу дослідження, оскільки у цей час активність КАТ у слизовій оболонці тонкої кишки тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг була на 60% ($p < 0,001$) нижче, ніж у тварин, які отримували іонофор у дозі 400 мг/кг.

Отже результати дослідження активності СОД та КАТ у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки свідчать про те, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі функціональних змін слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, індукованих неселективним інгібітором ЦОГ, призводить до значного та тривалого зниження активності ензимів-антиоксидантів.

Концентрація непрямих антиоксидантів у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки. При проведенні оцінки стану неферментної частини антиоксидантної системи слизової оболонки тонкої кишки дистального відділу тонкої кишки (рис. 4.9) було встановлено, що на I добу загальна відновлювальна активність (ЗВА) гомогенатів слизової оболонки була зниженою у всіх групах тварин. Порівняно із контролем значення цього показника були менші:

у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} – на 10% ($p < 0,05$); у тварин за умов блокування ЦОГ – на 15% ($p < 0,01$); у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ – на 21% ($p < 0,001$) при дозі іонофору 400 мг/кг та на 29% ($p < 0,001$) – при дозі іонофору 1000 мг/кг. На III добу значення ЗВА були нижче контрольних показників у тварин при блокуванні ЦОГ – на 13% ($p < 0,05$), а у тварин, які зазнавали комбінованого впливу модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} та блокування ЦОГ – на 26% ($p < 0,001$), при дозі іонофору 400 мг/кг, та на 36% ($p < 0,001$), при дозі іонофору 1000 мг/кг. На V добу значення показника, що розглядається для трьох зазначених груп тварин були менші на 13% ($p < 0,01$), 31% ($p < 0,001$) та 42% ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою. На VII добу значення ЗВА для тварин, які зазнавали лише блокування ЦОГ не відрізнялися від контролю, а у тварин при модуляції трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ – залишалися на попередньому низькому рівні.

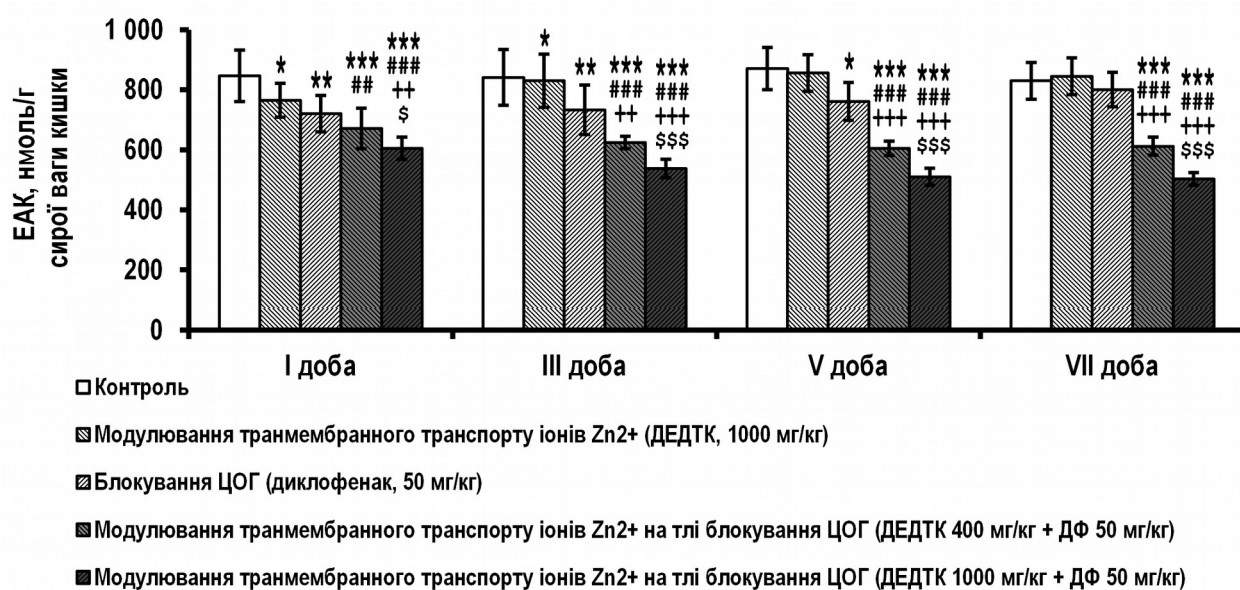


Рис. 4.9. Загальна відновлювальна активність слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, еквівалентів аскорбінової кислоти (ЕАК), нмоль/г сирової ваги ($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі).

На значно більший рівень напруження антиоксидантної системи слизової оболонки тонкої кишки щурів при модулюванні трансмембранного транспорту

іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ порівняно із тваринами, які зазнавали лише блокування ЦОГ вказує те, що показники ЗВА у тварин, які разом із інгібітором ЦОГ отримували іонофор у дозі 400 мг/кг на I добу були нижчі на 7% (н.з), на III добу – на 15% ($p<0,01$), на V добу – на 21% ($p<0,001$) та VII добу – на 24% ($p<0,001$) нижчі ніж у тварин, які отримували лише інгібітор ЦОГ; у тварин які отримували інгібітор ЦОГ та іонофор у дозі 1000 мг/кг у зазначені проміжки часу показники ЗВА були відповідно нижчі на 17% ($p<0,01$), 27% ($p<0,001$), 33% ($p<0,001$) та 37% ($p<0,001$). Окрім цього показники ЗВА слизової оболонки тонкої кишки тварин, які разом із інгібітором ЦОГ отримували більшу дозу іонофору (1000 мг/кг) протягом усього терміну дослідження відрізнялась від тварин, які одночасно із інгібітором ЦОГ отримували меншу дозу іонофору (400 мг/кг): на I добу ЗВА слизової оболонки кишки була нижче на 10% ($p<0,05$), на III добу – на 14% ($p<0,001$), V добу – на 16% ($p<0,001$) й на VII добу – на 18% ($p<0,001$) нижче, що вказує на більший ступень виснаження резервів антиоксидантної системи слизової оболонки кишки у тварин цієї групи.

Таким чином, проведена оцінка стану антиоксидантної системи слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки дозволила встановити факт значного вичерпання її резервів у тварин, які зазнавали модуляції трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ. Відомо, що за умов нормального фізіологічного стану прямі та непрямі антиоксиданти захищають тканини від шкідливої дії АФК. Однак за умов, коли рівень антиоксидантів знижується, а оксидантів навпаки, зростає, виникає оксидативне ураження клітин. Подібний стан часто спостерігається при запальних захворюваннях кишки [88, 201, 202]. Наприклад М.А. Patel (2001) було показано, що активність СОД у щурів при індукованому 6-тринітробензосульфоновою кислотою коліті на фоні зростання проксидантної активності тканини кишки знижується у 4,4 рази [263]. W.B. Song et al. (2010) наводять результати про те, що при індукованому метотрексатом ентериті активність СОД у тканині кишки знижується у 2,8 рази [118].

Швидкому розвитку оксидативного стресу у слизовій оболонці кишки сприяє те, що тканина кишки містить значні кількості ензимів-прооксидантів, які

приймають участь у синтезі АФК (ксантин оксидаза, циклооксигеназа та 5-ліпооксигеназа) [289]. До цього ж, кількість фагоцитів, які є основними постачальниками АФК, суттєво збільшується при запаленні тканини кишки [99]; подібне явище спостерігалось і в нашому дослідженні. З іншого боку відомо, що у хворих на різні форми ЗХК знижується рівень аскорбінової кислоти та токоферолу в крові та супероксиддисмутази, глутататіонпероксидази, каталази, рибофлавіну та β -каротину у тканині кишки [44, 88, 322]. Нами також було визначено зниження активності як ензимів-антиоксидантів, так і суми непрямих антиоксидантів у тонкій кишці, найбільш виражене при значному ушкодженні слизової оболонки у тварин, у тварин, в яких модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} поєднувалось із блокуванням ЦОГ. Такий стан (зниження рівня антиоксидантного захисту на фоні збільшеного синтезу прооксидантів) призводить до стійкого та значного оксидативного стресу у клітинах кишки при її запаленні, що також може робити суттєвий внесок в ушкодження слизової оболонки тонкої кишки та уповільнювати процеси її репарації [99].

Однак існує й альтернативний погляд на зниження активності ензимів-антиоксидантів за умов запальної відповіді, який ми вважаємо за потрібне навести, оскільки він стосується безпосередньо механізмів місцевого неспецифічного антибактеріального захисту. Виходячи з аспектів функціонування СОД деякі дослідники схильні відносити даний ензим до прооксидантів, оскільки у результаті її активності утворюється пероксид водню, також сильний окиснювач [276]. Виходячи з цього T.J. Break et al. (2012) вважають, що за умов бактеріальної інфекції зниження активності позаклітинної форми СОД може бути фізіологічно доцільним процесом, оскільки генерація АФК є ефективним механізмом для неспецифічного захисту від патогенів, а СОД нейтралізує супероксид-аніон і, тим самим, знижує ефективність антимікробної дії АФК [143]. A.K Lichtenstein et al, (1988) показали наявність синергізму між пероксидом водню та катіонними білками (дефенсинами), який проявляється у більш активному цитолізі клітин даними АМП у присутності H_2O_2 [314]; у такому випадку зниження активності КАТ може сприяти більш ефективній антибактеріальній дії даних антимікробних поліпеп-

тидів. Але як би то ні було, все ж необхідно визнати, що зниження активності СОД і КАТ є причиною дисбалансу механізмів антиоксидантного захисту слизової оболонки тонкої кишки та збільшення її вразливості до дії АФК [199].

4.5 Секреторна активність клітин Панета дистального відділу тонкої кишки щурів за умов модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ

Завершальним етап нашого дослідження полягав у оцінці секреторної активності клітин Панета за таким показником, як вміст у їх секреторних гранулах цинку й катіонних білків. У тонкій кишці ці клітини, поряд із тим, що забезпечують місцевий антимікробний захист слизової оболонки, виступають також у якості регулятора активності неспецифічної ланки імунної системи [82, [Ошибка: источник перекрёстной ссылки не найден](#), 115].

За результатами цитохімічного дослідження клітин Панета слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки щурів (рис. 4.10) було встановлено, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} призводило до значного зменшення вмісту в клітинах Панета щурів як цинку, так і катіонних білків, порівняно з контрольними тваринами, на що вказує зменшення площі секреторних гранул, які містили продукти цитохімічних реакцій дитизону та бромфенолового синього. Так, на I добу у тварин цієї групи площа секреторних гранул клітин Панета при забарвленні дитизоном була менша на 83% ($p < 0,001$), а бромфеноловим синім – на 69% ($p < 0,001$) менша, ніж у контролі. На III добу площа гранул забарвлених дитизоном була менша на 36% ($p < 0,01$), а бромфеноловим синім – на 31% ($p < 0,01$) ніж у контрольних щурів. На V добу – статистично не відрізнялись від них, а на VII добу площа гранул забарвлених бромфеноловим синім, була навіть більше на 6% ($p < 0,05$) за показники інтактного контролю.

При блокуванні ЦОГ у тварин площа секреторних гранул клітин Панета забарвлених дитизоном була менша на 42% ($p < 0,001$), а бромфеноловим синім –

на 39% ($p < 0,001$), а на III добу відповідно менше на 34% ($p < 0,001$) та 35% ($p < 0,001$) ніж у контрольних тварин. Починаючи з V доби площа секреторних гранул у тварин цієї групи почала поступово збільшуватись: у даний час цей показник для гранул забарвлених дитизоном був меншим на 10% ($p < 0,05$), а бромфеноловим синім – на 7% ($p < 0,01$) меншим, ніж у контролі. На VII площа гранул забарвлених як дитизоном, так і бромфеноловим синім не відрізнялась від показників контрольної групи.

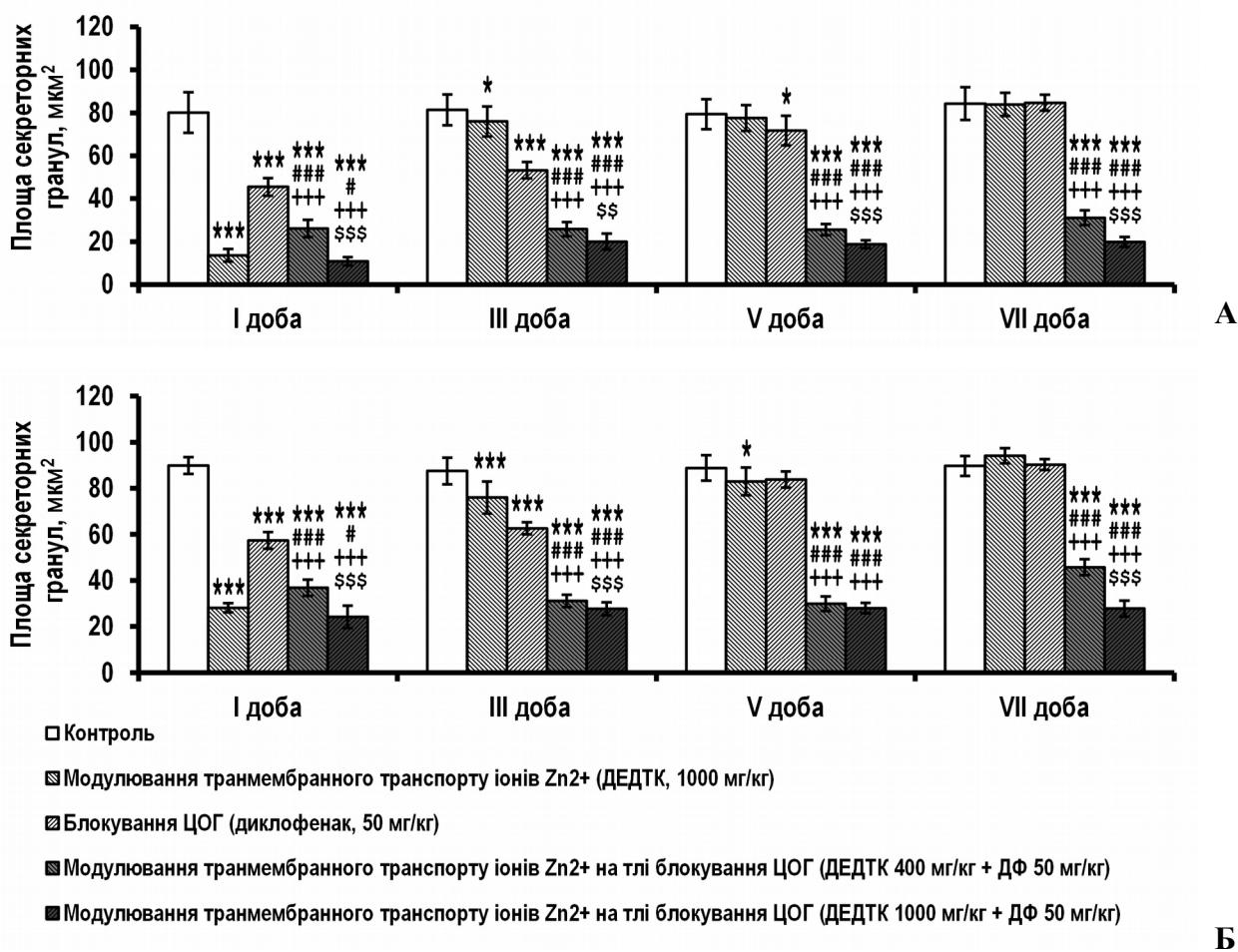


Рис. 4.10. Площа секреторних гранул клітин Панета дистального відділу тонкої кишки забарвлених дитизоном (А) та бромфеноловим синім (Б) у I-VII добу дослідження ($M \pm SD$; $n = 40$ у кожній групі).

У тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ спостерігалось значне зниження вмісту як цинку, так і катіонних білків у секреторних гранулах клітин Панета, а також на відміну від тварин, які

заснавали лише блокування ЦОГ, у них була відсутня тенденція до нормалізації даних показників протягом усього терміну дослідження. Площа секреторних гранул, забарвлених дитизоном у тварин, які разом із інгібітором ЦОГ отримували іонофор у дозі 400 мг/кг, була меншою, ніж в контрольних щурів: на I добу на 59% ($p<0,001$), на III добу – на 64% ($p<0,001$), V добу – на 66% ($p<0,001$) і на сьому добу – на 49% ($p<0,001$) менше. У тварин, які одночасно отримували інгібітор ЦОГ та іонофор у дозі 1000 мг/кг, у зазначені часові інтервали площа гранул, забарвлених дитизоном була меншою, ніж в інтактному контролі відповідно на 73% ($p<0,001$), 68% ($p<0,001$), 68% ($p<0,001$) та 69% ($p<0,001$). При забарвленні клітин Панета бромфеноловим синім були отримані наступні результати: у тварин, які отримували меншу дозу іонофору площа секреторних гранул порівняно з контрольною групою була на I добу менше на 67% ($p<0,001$), на III добу – на 68% ($p<0,001$), на V добу – на 68% ($p<0,001$) і на VII добу – на 63% ($p<0,001$) менше. У тварин, які отримували більшу дозу іонофору, площа забарвлених гранул була менша на 87% ($p<0,001$), 75% ($p<0,001$), 76% ($p<0,001$) та 77% ($p<0,001$) відповідно до зазначених часових інтервалів.

Проведений статистичний аналіз відмінностей між обома групами тварин, які одночасно із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} заснавали блокування ЦОГ, дозволив встановити, що площа секреторних гранул клітин Панета, забарвлених дитизоном протягом усього терміну дослідження у тварин, які отримували іонофор у дозі 1000 мг/кг була меншою, ніж у тварин, доза іонофору в яких дорівнювала 400 мг/кг: на I добу – на 59% ($p<0,001$), на III добу – на 23% ($p<0,01$), на V добу – на 27% ($p<0,001$) та на VII добу – на 37% ($p<0,001$) меншою, а площа секреторних гранул Панета, забарвлених бромфеноловим синім, була відповідно менша: на I добу на 34% ($p<0,001$), на III добу на – 21% ($p<0,001$), на V добу – статистично не відрізнялась, і на VII добу – знову була менше на 40% ($p<0,001$).

На фотографіях (рис. 3.15) показано забарвлення секреторних гранул клітин Панета, які містять продукт цитохімічної реакції дитизону (іони Zn^{2+}) та бромфеновлового синього (антимікробні катіонні білки).

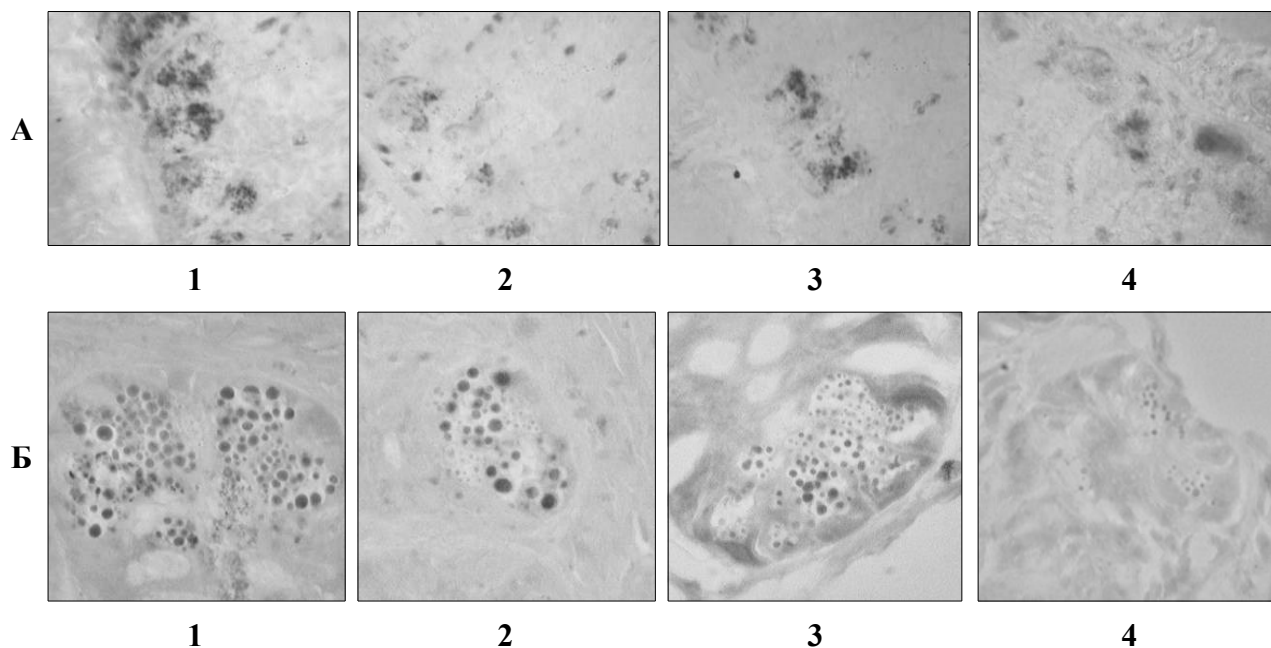


Рис. 3.15. Площа секреторних гранул клітин Панета забарвлених дитизоном (А) і бромфеноловим синім (Б) на I добу після введення препаратів. 1 – контроль, 2 – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (ДЕДТК, 1000 мг/кг), 3 – блокування циклооксигенази (диклофенак, 50 мг/кг), 4 – модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування циклооксигенази (ДЕДТК, 1000 мг/кг + диклофенак, 50 мг/кг). Збільшення $\times 400$ (I) і $\times 1000$ (II).

Таким чином було встановлено, що секреторна активність клітин Панета певною мірою залежить від ступеня запальної відповіді у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки, що може бути пояснено змінами кількісного та якісного складу пристінної мікрофлори тонкої кишки, наведеними вище. Встановлений факт збільшення секреторної активності клітин Панета у тварин при модулюванні трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} , яке відбувалося на тлі блокування ЦОГ пояснюється збільшеним бактеріальним навантаженням. Відомо, що клітини Панета – важлива ланка місцевого антибактеріального захисту епітелію тонкої кишки, а секреція АМП цими клітинами відбувається дозозалежним чином внаслідок стимуляції рецепторів клітин кишкового епітелію бактеріальними антигенами. Живі Грам-негативні та Грам-позитивні бактерії, а також ліпополісахариди, ліпотейхоева кислота, мураміддипептид призводять до швидкої секреції АМП та іонів Zn^{2+} клітинами Панета [299, 350].

Тому ми можемо констатувати, що уведення неселективного інгібітору ЦОГ хоча і призводило до виражених ушкоджень слизової оболонки та дисбіотичних змін у складі пристінної мікрофлори тонкої кишки, проте носило короточасний характер. Одночасне із модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} блокування ЦОГ викликало більш суттєві ушкодження слизової оболонки та супроводжувалась не тільки кількісними змінами складу пристінної мікрофлори, а й появою умовно-патогенних бактерій. Все це призводило до значно більш вираженої активації місцевих механізмів місцевого антибактеріального захисту, вираженого ушкодження слизової оболонки кишки і як наслідок – тривалого запалення. Більш того, тривала активація секреторної активності клітин Панета, яка спостерігалась у тварин при модуляції трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування ЦОГ також може бути одним з факторів, що обумовлює хемотаксис нейтрофілів до тканини кишки, і, як наслідок, виражену лейкоцитарну інфільтрацію впродовж усього терміну дослідження, оскільки відомо, що як дефенсини, так і іони Zn^{2+} викликають хемотаксис та адгезію нейтрофілів [174, 300, 98, 174]. Окрім цього, підвищений рівень секреції дефенсинів може негативно впливати на стан ЕБК, збільшуючи його проникність [254].

РОЗДІЛ 5

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Попередня гіпотеза про те, що іони Zn^{2+} можуть відігравати роль регулятора функціонального стану слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за умов її запалення була сформульована на основі результатів власних попередніх спостережень та аналізу літературних даних і у цілому підтвердилась у ході дослідження, оскільки нами було встановлено, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} суттєво збільшує тяжкість структурно-геморагічних ушкоджень слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за умов порушення її функціонального стану, індукованого блокуванням ЦОГ. Ґрунтуючись на власних результатах та літературних даних можна запропонувати наступну схему, яка пояснює фізіологічний механізм регуляції запальної відповіді за участю іонів Zn^{2+} (рис. 5.1).

У тварин за умов блокування ЦОГ виразкові ураження тканини кишки виникають внаслідок двох ключових подій. Першою подією є те, що уведення диклофенака у дозі 50 мг/кг призводить до пригнічення синтезу простагландинів у тканині тонкої кишки, рис. 5.1 — 1 [84, 85, 333, 335]. Низький рівень простагландинів у першу чергу обумовлює зниження резистентності СОТК до впливу несприятливих факторів кишкового вмісту (жовчних кислот, травних ферментів), оскільки прстагландини відіграють важливу роль у процесах проліферації стовбурових клітин кишкового епітелію, і відповідно, регулюють процеси його репарації [277, 333, 335]. Більш того, особливі умови функціонування епітелію дистального відділу тонкої кишки (наявність достатньої кількості поживних речовин, найвища концентрація бактеріальної мікрофлори, порівняно із проксимальними відділами тонкої кишки, близько розташоване джерело фекальної мікрофлори у сліпій кишці) та функціональні особливості (значно менша товщина шару слизу ніж у товстій кишці) призводять до того, що слизова оболонка тонкої кишки постійно знаходиться у стані так званого “контрольованого запалення” [228].

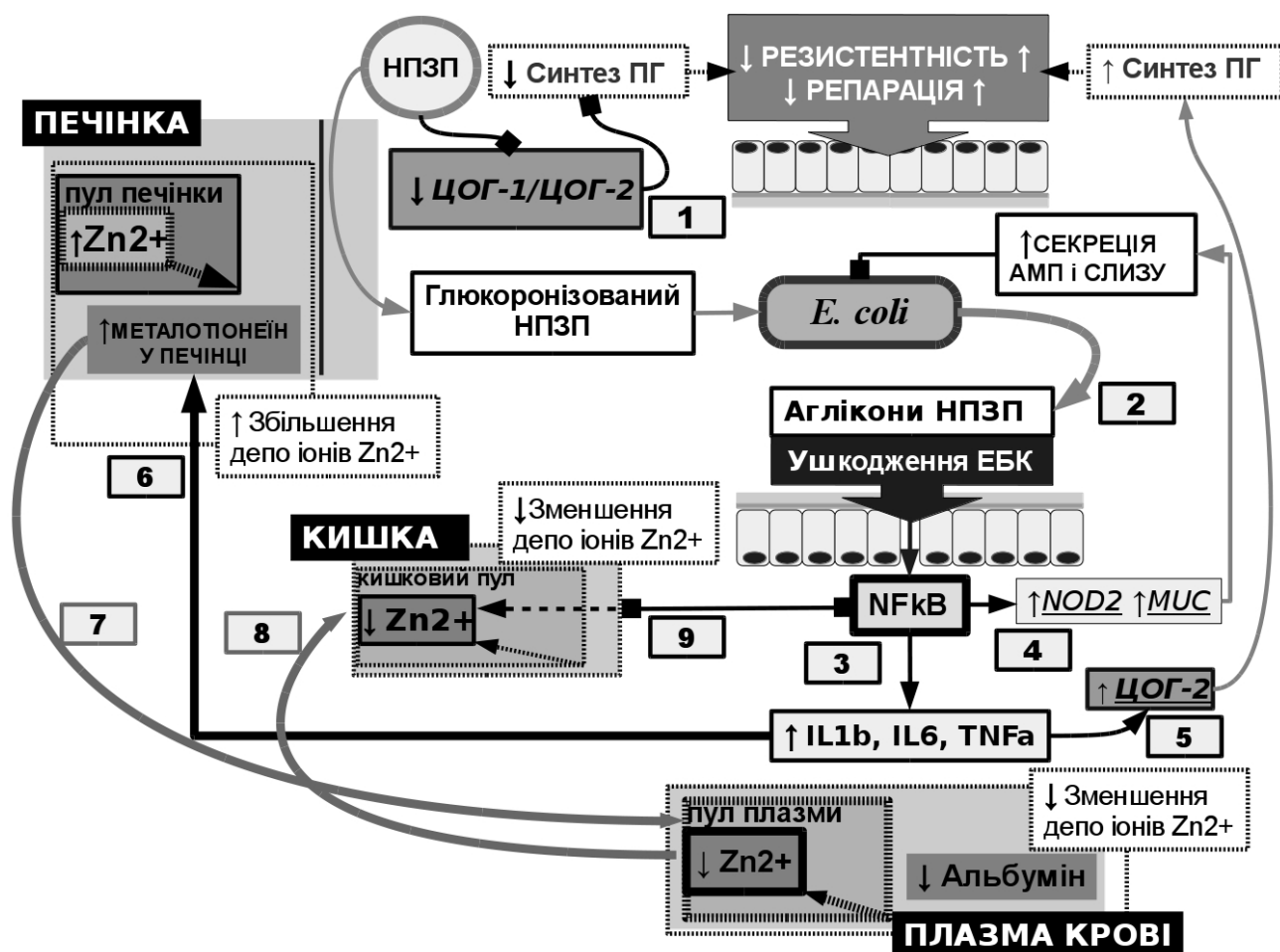


Рис. 5.1. Роль іонів Zn²⁺ у регуляції запальної відповіді COTK за дії неселективного інгібітора ЦОГ. Пояснення у тексті. Умовні позначення: ← активація; ■ — пригнічення; стрілками сірого ко-льору позначені причино-наслідкові зв'язки.

Порушення будь якої ланки цього складного механізму, може призвести до втрати організмом контролю над бактеріальною мікрофлорою, і відповідно призвести до неконтрольованого запального процесу [76, 159]. Висока проліферативна активність кишкового епітелію, повне оновлення пулу якого відбувається за 48 годин, є одним з найважливіших механізмів підтримки гомеостазу слизової оболонки тонкої кишки і потребує точного узгодження процесів проліферації та апоптозу [73]. Тому навіть короточасне зниження синтезу простагландинів може бути критичним фактором для виникнення ушкоджень слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки. У разі уведення неселективних інгібіторів ЦОГ

подібний стан ускладнюється тим, що метаболіти НПВП проявляють властивості місцевого подразника у слизовій оболонці тонкої кишки [84, 85].

Друга ключова подія – це утворення у порожнині дистального відділу тонкої кишки під впливом бактеріальної β -глюкоронідази ентеробактерій вільних агліконів фармакінетичного перетвореного у печінці НПЗП, який потрапляє до кишки разом із жовчю внаслідок його гепатобілярної екскреції. Вільні аглікони ушкоджують ентероцити, призводячи до їх некрозу, рис 5.1 — 2 [85]. Даному процесу у тому числі сприяє знижена внаслідок пригнічення синтезу простагландинів резистентність епітелію слизової оболонки тонкої кишки [101]. Зростання кількості ентеробактерій, у тварин які отримували інгібітор ЦОГ у нашому дослідженні є характерним для змін складу кишкової мікрофлори при НПЗП-індукованій ентеропатії [333, 335]. Саме збільшення кишкової палички на думку багатьох дослідників є основним фактором розвитку ушкоджень слизової оболонки тонкої кишки за дії неселективних інгібіторів ЦОГ, оскільки було показано, що у аксенних щурів, яких утримують у стерильних умовах, НПВП не викликають ушкоджень слизової оболонки, а використання антибактеріальних препаратів зменшує тяжкість уражень слизової оболонки за дії неселективних інгібіторів ЦОГ [233, 252, 287]. Токсичний вплив агліконів, який призводить до некрозу ентероцитів, порушує цілісність епітеліального бар'єру кишки (ЕБК) [85]. Дані порушення цілісності слизової оболонки кишки (виразкоутворення, зміни мікроархитектури кишкових ворсинок) та зменшення бар'єрної функції кишкового епітелію були визначені і у нашому дослідженні у щурів, які отримували неселективний інгібітор ЦОГ диклофенак. За умов неспроможності ЕБК виконувати одну з головних функцій, а саме – обмежувати потрапляння бактеріальних антигенів до тканини кишки, значно збільшується контакт TLR рецепторів ентероцитів із патоген-асоційованими молекулярними паттернами Грам-негативної мікрофлори (ПАМП) — ліпополісахаридами, мураміл-дипептидами та ін. Стимуляція TLR рецепторів призводить до активації MAPK та NF κ B сигнальних шляхів, рис. 5.1 — 3 [168, 231].

Активація транскрипційного фактора NF κ B призводить до збільшення експресії гену *NOD2* у клітинах Панета і гену *MUC* – у келихоподібних клітинах,

що є причиною збільшення рівня секреції АМП і муцину, рис. 5.1 — 4. Обидва ці процеси спрямовані на пригнічення бактеріальної мікрофлори і відновлення порушеного мікробного гомеостазу тонкої кишки. Подібні зміни спостерігались і у нашому дослідженні у щурів за монофакторної за умов блокування ЦОГ у рані строки дослідження, про що свідчить значна активація секреторної функції клітин Панета. Важливо зазначити, що активація NFκB призводить і до збільшення рівня експресії гену *ЦОГ-2*, що позитивно впливає на процеси репарації кишкового епітелію при запальній реакції, рис. 5.1 — 5 [184, 308, 329].

Окрім збільшення експресії генів *NOD2* і *MUC* важливим наслідком активації транскрипційного фактора NFκB є збільшення експресії гену *SLC39A8*, який кодує трансмембранний імпортер цинку *Zip8*. Наслідком цього є збільшення потоку у клітини іонів Zn^{2+} з позаклітинного простору. Іони Zn^{2+} , які надходять до клітин, пригнічують фосфорилування IκBα (інгібуючої субодиниці NFκB) ІКК кіназою, зменшуючи у такий спосіб інтенсивність запальної відповіді [321]. Відомий і інший механізм пригнічення іонами Zn^{2+} транскрипційного фактора NFκB, пов'язаний із активувальним впливом іонів даного МЕ на експресію протеїну A20, який ізолює NFκB у цитоплазмі та пригнічує у такий спосіб ІЛ-6 та ТНФ-α опосередковану активацію даного транскрипційного фактора, що у наслідку призводить до зниження активації NFκB та зменшення експресії генів прозапальних цитокинів ТНФ-α, ІЛ-1, ІЛ-8 [54, 63]. Наведені літературні дані пояснюють молекулярні механізми відомого потужного протизапального ефекту іонів Zn^{2+} .

Саме тому важливо зазначити, що у тварин за умов блокування ЦОГ у рані строки дослідження відбувалося зменшення концентрації іонів Zn^{2+} у тканині тонкої кишки і плазмі крові та зростання — у паренхімі печінки. Подібні зміни, враховуючи вищевикладені дані про механізм антизапальної дії іонів Zn^{2+} , на нашу думку, можуть бути тим чинником, завдяки якому знижується гальмівна дія іонів Zn^{2+} на транскрипційний фактор NFκB у клітинах кишкового епітелію, що у наслідку призводить до активації запальної реакції та місцевих механізмів антимікробного захисту слизової оболонки тонкої кишки у відповідь на дію збільшеного бактеріального навантаження [271]. Дане припущення ґрунтується на тому, що з

ряду літературних джерел відомо, що зниження концентрації вільних іонів Zn^{2+} у ділянках запалення і плазмі крові та збільшення – у паренхімі печінки є характерною ознакою запального процесу будь-якої локалізації [268, 269, 110, 111, 268, 269, 271]. Подібний перерозподіл іонів Zn^{2+} обумовлений збільшенням рівня синтезу металотіонеїнів (МТ) при активації NF κ B сигнального шляху [268, 269, 232]. При бактеріальних інфекціях експресія гену металотіонеїну зростає майже у всіх органах: у печінці, нирках, підшлунковій залозі, кишці, легенях, серці, мозку, яєчниках, матці та селезінці [121, 114, 247, 294, 298]. Даний процес опосередковується головним чином дією прозапальних цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-6, ФНП- α , і), рис. 5.1 — 6, а також нітрогену оксидом та глюкокортикоїдами. Активні форми кисню (АФК), які синтезуються під час запальної відповіді у слизовій оболонці кишки також активують експресію МТ [60, 178].

Підвищення синтезу металотіонеїну у печінці збільшує її здатність до депонування катіонів двовалентних металів і призводить до зниження концентрації іонів Zn^{2+} у плазмі крові, рис. 5.1 — 7 [268, 269]. Також відомо, що при більшості інфекційних процесів відбувається зниження альбуміну у плазмі крові, із яким зв'язано приблизно 90% зв'язаних із білками іонів Zn^{2+} , які знаходяться у плазмі [146]. Таким чином здатність плазми до депонування та транспорту іонів Zn^{2+} знижується. Внаслідок цих подій доступність іонів даного МЕ для клітин кишкового епітелію значно обмежується і відбувається зниження його концентрації у цитозолі ентероцитів, рис. 5.1 — 8.

Обмеження доступності іонів Zn^{2+} розгальмовує процес фосфорилування І κ B α ІКК кіназою у цитоплазмі клітин кишкового епітелію і позитивно впливає на подальшу активацію NF κ B сигнального шляху, 5.1 — 9. Цей процес, на нашу думку, забезпечує підтримку запальної відповіді на адекватному по відношенню до сили бактеріальної стимуляції рівні. Виявлені у нашому дослідженні процеси інфільтрації тканини кишки лейкоцитами, збільшення активності проксидантів та зниження активності антиоксидантів та підвищена секреторна активність клітин Панета у тварин за монофакторної дії інгібітору ЦОГ, носила лише тимчасовий характер, що вказує на спроможність механізмів місцевого бактеріального захисту

до відновлення нормального складу кишкової мікрофлори. При поступовому відновленні бар'єрної функції ЕБК, яке спостерігалось у тварин за монофакторної дії інгібіторів ЦОГ, рівень активації TLR рецепторів під дією ПАМП зменшується, і, відповідно, знижується експресія гену металотіонеїну, обумовлена активацією NFκB сигнального шляху. Це призводить до вивільнення іонів Zn^{2+} , депонованих у печінці і відповідно, підвищення концентрації даних іонів, доступних для транспорту до клітин кишкового епітелію. Збільшення потоку іонів Zn^{2+} у ентероцити викликає пригнічення NFκB сигнального шляху, і відповідно, зменшення запальної відповіді. Дійсно, нами було встановлено, що при відновленні бар'єрної функції кишкового епітелію, концентрація цинку у слизовій оболонці тонкої кишки і плазмі крові поступово зростала, а у паренхімі печінки – знижувалась до контрольних значень.

При аналізі результатів дослідження особливу увагу привертає той факт, що уведення іонофору (ДЕДТК) призводить до підвищення концентрації іонів Zn^{2+} у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки тварин на I добу дослідження. Даний стан обумовлений тим, що ДЕДТК у позаклітинному просторі утворює із цинком хелатний комплекс $[Zn : 2ДЕДТК]$, який має виражені ліпофільні властивості, і тому легко проникає крізь мембрани до клітин шляхом пасивного транспорту за електрохімічним градієнтом [208, 139]. У цитозолі даний комплекс протягом 10–15 хв. метаболізується тіолметилтрансферазою і тіопуринметил-трансферазою (КФ 2.7.1.67) до хімічних сполук, які втрачають здатність утримувати катіони металів. Отже при цьому відбувається вивільнення іонів цинку і, відповідно, підвищення його концентрації у клітинах [92, 285]. Відомо, що ДЕДТК та його близькі похідні є надзвичайно потужними інгібіторами NFκB сигнального шляху, здатними суттєво пригнічувати запальну відповідь на ранніх етапах її індукції [209, 127]. Більш того, дана властивість ДЕДТК проявляється лише при наявності у середовищі іонів Zn^{2+} [280, 349].

Саме завдяки цим властивостям ДЕДТК концентрація іонів Zn^{2+} у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки при індукції запальної відповіді у

тварин, які одночасно зазнавали дії інгібітору ЦОГ та іонофору, майже не змінювалась на відміну від щурів, які зазнавали лише дії інгібітору ЦОГ, і в яких концентрація цинку у слизовій оболонці тонкої кишки на I добу дослідження знижувалась на 41% порівняно з контрольною групою.

Враховуючи властивість ДЕДТК як потужного інгібітора NFκB та те, що вона проявляється лише при наявності іонів Zn^{2+} у біологічному середовищі, ми можемо припустити, що зростання потоку іонів Zn^{2+} до клітин, викликане уведенням іонофору, за дії інгібітора ЦОГ призводило до стримування розвитку запальної реакції у слизовій оболонці тонкої кишки за механізмом гальмування іонами Zn^{2+} процесу фосфорилування IκBα ІКК-кіназою. Окремо зазначимо, що збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів Zn^{2+} за умов запальної реакції знижує експресію ЦОГ-2 [191, 181, 341, 347], що за умов пошкодження кишкового епітелію також є несприятливим фактором для його розвитку [184].

Тому нашу думку основною причиною, яка обумовлює найбільшу ступень ураження слизової оболонки тонкої кишки тварин за комбінованої за умов блокування ЦОГ та іонофору є порушення процесів активації запальної відповіді внаслідок підвищеної концентрації іонів Zn^{2+} у тонкій кишці, що у наслідку призводить до тривалого запального процесу. Це ствердження базується на результатах, які демонструють, що у тварин при комбінованій дії іонофору та інгібітору ЦОГ спостерігались значно більш виражені ураження слизової оболонки кишки: більш виражена та тривала лейкоцитарна інфільтрація тканини кишки та дисбаланс оксидантно-антиоксидантної системи, підвищена секреторна активність клітин Панета. Більш того, і само по собі модулювання трансмембранного обміну іонів Zn^{2+} також призводило до порушення гомеостатичних систем слизової оболонки тонкої кишки, на що вказує збільшення кількості бактерій-коменсалів, зниження активності оксидантно-антиоксидантної системи, підвищена секреторна активність клітин Панета. Однак за умов неушкодженого епітеліального бар'єру слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки ці зміни носили вкрай нетривалий характер.

Підсумовуючи вищевикладені результати зауважимо, що отримані нами факти свідчать, що як неселективний інгібітор ЦОГ диклофенак, так і інгібітор NFκB сигнального шляху ДЕДТК, за механізмом тимчасового пригнічення запальної відповіді порушують стан “контрольованого запалення” у слизовій оболонці тонкої кишки. Подібний вплив є вкрай негативним, оскільки призводить до втрати контролю над бактеріальною мікрофлорою. Однак порушення епітеліального бар'єру за умов блокування ЦОГ призводить до активації NFκB сигнального шляху, швидкого розвитку запальної реакції та адекватної місцевої антибактеріальної відповіді. Порушення цілісності ЕБК за умов блокування ЦОГ у поєднанні із дією інгібітору NFκB (ДЕДТК), дія якого обумовлена збільшенням транспорту іонів Zn^{2+} до клітин кишкового епітелію, призводить до неспроможності епітеліального бар'єру контролювати склад бактеріальної мікрофлори тонкої кишки. Внаслідок цього відбувається швидке та неконтрольоване збільшення кількості бактерій-коменсалів та поява умовно-патогенної мікрофлори. У подальшому, при усуненні гальмівного впливу ДЕДТК на розвиток запальної відповіді, вже на фоні значного бактеріального навантаження та вираженого ушкодження слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, відбувається гіперактивація місцевого неспецифічного захисту, про що свідчить виражена лейкоцитарна інфільтрація тканини кишки та суттєве зростання її прооксидантної активності. Подібний перебіг запальної реакції призводить до тривалого виснаження резервів антиоксидантної системи слизової оболонки кишки (тривалого зменшення активності супероксиддисмутази і каталази, зниження концентрації непрямих антиоксидантів). На неспроможність місцевого антибактеріального захисту відновити контроль над кишковою мікрофлорою у тварин за умов сукупної дії інгібітору ЦОГ та іонофору вказує і тривала активація секреторної функції клітин Панета.

Таким чином, отримані нами результати вказують на важливе фізіологічне значення іонів Zn^{2+} як одного з регуляторів індукованої неселективним інгібітором ЦОГ запальної реакції у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведені дослідження ролі іонів Zn^{2+} у регуляції функціональних змін слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки в щурів за умов інгібування циклооксигенази. Доведено, що модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування циклооксигенази збільшує тяжкість структурно-геморагічних ушкоджень слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки та тривалість перебігу запального процесу. Проаналізовано роль іонів Zn^{2+} як одного з факторів регуляції бар'єрної функції слизової оболонки тонкої кишки.

1. Серед апробованих моделей альтерації слизової оболонки тонкої кишки найбільш оптимальною для дослідження ролі іонів Zn^{2+} у її функціональних змінах за умов запальної реакції є модель з використанням неселективних інгібіторів циклооксигенази, зокрема диклофенаку.
2. Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокування циклооксигенази призводить до збільшення концентрації іонів Zn^{2+} у слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки на 17% ($p < 0,01$) і в паренхімі печінки – на 12% ($p < 0,01$), та зменшення – у сироватці крові на 36% ($p < 0,001$).
3. Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} за умов блокування циклооксигенази призводить до появи в складі пристінної мікрофлори дистального відділу тонкої кишки умовно-патогенних бактерій (*Staphilococcus epidermidis*, *Staphilococcus viridans*, *Acinetobacter haemolyticus* та *Cronobacter sakazakii*) і змінює кількісне співвідношення представників нормофлори порівняно із відповідними показниками при блокуванні циклооксигенази. Залежно від дози уведеного на тлі блокування циклооксигенази іонофору (400 або 1000 мг/кг) кількість біфідобактерій зменшується у 23 та 177 разів ($p < 0,001$), лактобацил – у 36 та 637 разів ($p < 0,001$); кількість ентеробактерій збільшується у 1,5 та 4,5 разу ($p < 0,001$), а ентерококу (при дозі іонофору 1000 мг/кг) – у 4,8 разу ($p < 0,001$).

4. Модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} за умов блокування циклооксигенази призводить до потенціювання його негативного впливу на слизову оболонку дистального відділу тонкої кишки. Залежно від дози іонофору (400 або 1000 мг/кг) площа виразкових уражень зростає у 1,9 та 2,4 разу ($p < 0,001$), а кількість екстрагованого з кишкового епітелію нігрозину збільшується на 27% ($p < 0,01$) та 38% ($p < 0,001$) порівняно з відповідними показниками тварин, які зазнавали лише блокування циклооксигенази.
5. За умов одночасного модулювання трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} (доза іонофору 400 мг/кг) та блокування циклооксигенази в слизовій оболонці дистального відділу тонкої кишки на першу добу відзначається зменшення активності мієлопероксидази на 28% ($p < 0,01$), супероксиддисмутази – на 27% ($p < 0,01$), каталази – на 22% ($p < 0,01$), концентрація нітритів знижується на 27% ($p < 0,001$) порівняно із показниками тварин, які зазнавали лише блокування циклооксигенази. Збільшення дози іонофору до 1000 мг/кг на тлі блокування циклооксигенази призводить до зменшення активності мієлопероксидази (на 77%, $p < 0,001$), супероксиддисмутази (на 37%, $p < 0,01$), каталази (на 43%, $p < 0,05$) та зниження концентрації нітритів (на 53%, $p < 0,001$). На третю добу дослідження прооксидантна активність слизової оболонки тонкої кишки підвищується, що призводить до вираженого виснаження резервів її антиоксидантної системи до сьомої доби дослідження включно.
6. Зміни складу пристінної мікрофлори слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки на тлі зниження її бар'єрної функції, обумовленої модулюванням трансмембранного транспорту іонів Zn^{2+} на тлі блокуванні циклооксигенази, призводить до тривалого збільшення секреції клітинами Панета іонів Zn^{2+} та катіонних білків: залежно від дози іонофору (400 або 1000 мг/кг) площа їх секреторних гранул зменшується в середньому на 60%-66% ($p < 0,01$) та 70%-79% ($p < 0,001$) відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г.Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1980. – 216 с.
2. Барабой В. А. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита при патологии / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой, Ю. А. Зозуля. – М. : «Знание-М», 2005. – С. 280.
3. Берегова Т.В. Вміст цинку та секреторного матеріалу в гранулоцитах крові та базальних відділів кишкових крипт при стресі // Т.В. Берегова, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт // Фізіологічний журнал. – 2010. – Т. 56, № 5. – С. 40-44.
4. Берегова Т.В. Зміни вмісту цинку в крові та клітинах різних органів при стресових впливах // Т.В. Берегова, Н.В. Григорова, Ю.В. Єщенко [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 29-33.
5. Бойко Т.Й. Епідеміологічні особливості запальних захворювань кишечника за даними ДУ «Інститут гастроентерології НАМНУ» / Т.Й. Бойко // Гастроентерологія. – 2013. – Т. 1, № 47. – С. 6–9.
6. Бондаренко В.М. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта // В.М. Бондаренко, Б.Е. Боев // Российский журнал гастроэнтерологии, колопроктологии. – 1998. – № 1. – С. 66.
7. Бондаренко В.М. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры / В.М. Бондаренко, В.Г. Петровская // Вестн. РАМН. – 1997. – № 3. – С. 7–10.
8. Влияние эндоканнабиоидов на активность антиоксидантных ферментов в крови в острую фазу системного воспаления, вызванного введением липополисахарида / Н.Б. Горбунова, Р.Д. Зильберман, Т.О. Павлють, А.Ю. Молчанова // Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций : сборник тезисов XIII съезда Белорусского общества физиологов, 19-20 апреля 2012 г., Минск, Беларусь. – Минск, 2012. – С. 36.
9. Голиков П. П. Роль оксида азота в патологии / П. П. Голиков, А. П. Голиков // Архив патологии. – 2005. – № 4. – С. 24–32.

10. Гольдберг Е.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы / Е.Д. Гольдберг, В.А. Ещенко, В.Д. Бовт. – Томск: Изд-во ТГУ, 1993. – 136 с.
11. Ещенко В.А. Гистохимическое исследование цинка / В.А. Ещенко // Цитология. – 1978. - №8. – С. 927–933.
12. Ещенко Ю.В. Действие хелатирующих агентов на предстательную железу у крыс / Ю.В.Ещенко, В.В. Новицкий, В.Д. Бовт [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №3. – С. 65–67.
13. Єщенко В.А. Вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета мишей і щурів різного віку / В.А. Єщенко, Н.В. Григорова, Н.Л. Петриченко // Актуальні питання біології, екології та хімії. – 2012. №1. – С. 30–34.
14. Єщенко Ю.В. Роль хелатоутворюючих металів в клітинах різних органів в реалізації стрес-реакції / Ю.В. Єщенко дис д-ра біологічних наук : 03.00.13. – Київ, 2012. – 399 с.
15. Звягинцева Т. В. Метаболиты оксида азота в крови и моче здоровых людей: их связь с цитокинами и гормонами // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2002. – Т. 3, № 2. – С. 302–304.
16. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры кишечника у клинически здоровых детей в раннем возрасте / Е. А. Постникова, А.П. Пикина, Л.И. Кафарская, Б.А. Ефимов // Журн. микробиол. – 2004. –№1.– С. 67–69.
17. Кополадзе Р.А. Регламентация экспериментов на животных – этика, законодательства, альтернативы / Р.А. Кополадзе // Успехи физиологических наук. – 1998. – Т. 29, № 4. – С.74–89.
18. Костюк О.П. Физиологические и терапевтические свойства лактобактерий / О.П. Костюк, Л.И.Чернышов, А.П. Волхова. // Педиатрия. – 1998. – № 1. – С. 71-73.
19. Крамарь О.Г. Микробные популяции и биоценозы при острых кишечных инфекциях, вызванных условно–патогенными микроорганизмами / О.Г. Крамарь : автореф. дисс... канд. мед. наук. – М., 1997, 24с.
20. Кузнецова Г.Г. Влияние пищевых биопродуктов с пробиотическими свойствами на микроэкологию кишечника детей раннего возраста / Г.Г. Кузнецова,

- И.Б. Куаева, Т.Н. Сорвачева [и др.] // Материалы всероссийской конференции «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека». – Москва, 1-23 апреля 1999. – С. 67–70.
21. Метельская В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
22. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарева // Лаб. Дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
23. Методы биохимического анализа растений // Учебное пособие (Ред.: Полевой В.В., Максимов Г.Б. – Л.: изд-во Ленингр. ун-та. – 1978. – 192 с.
24. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош [и др.] // Л.: Агропромиздат. – 1987. – С. 41–45.
25. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов / [под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова]. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
26. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / [Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л.С.]. – М. : Медицина, 1991. – 496 с.
27. Миронов П. И. Молекулярные аспекты системного воспалительного ответа / П.И. Миронов, В. Ф. Альес // Анестезиология. – 2000. – № 4. – С. 1–4.
28. Михалевич О. Д. Некоторые особенности перекисного окисления липидов и возможности его коррекции / О. Д. Михалевич, Э. Г. Горожанская // Потофиз. и эксперим. терапия. – 2006. – Т. 16, № 4–6. – С. 393–398.
29. Мухин В.И. Дифференциальная диагностика цекоилеальной рефлюксной болезни и синдрома раздраженного кишечника / В.И. Мухин, И.В. Фёдоров // Казанский медицинский журнал. – 2008. – Т. 89, № 3. – С. 247-251.
30. Новицкий В.В. Содержание цинка в клетках панета и предстательной железы при действии хелатирующих и стрессовых факторов / В.В. Новицкий, Ю.В. Ещенко, В.Д. Бовт [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2011. – № 8. – С.140–143.

31. Паленая Ю.В. Морфо-биохимические изменения в тонком кишечнике при воздействии ионизирующего излучения / Ю.В. Паленая, Т.Г. Филоненко, В.В. Казакова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия “Биология. Химия”. – 2006. – Т. 19, №1. – С. 80–85.
32. Пат. 31012 Україна, МПК А61Р31/00. Спосіб моделювання дисбіозу (дисбактеріозу) / Левицький А.П., Селіванська І.О., Цисельський Ю.В., Почтар В.М., Розсоханова Л.М., Гулавський В.Т. ; заявник і власник Інститут стоматології АМН України. – № u200611609 ; заявл. 22.10.2007 ; опубл. 20.03.2008, Бюл. № 6.
33. Пат. 65514 Україна, МПК6 G01N33/50, G01N33/569. Спосіб визначення катіонних білків у клітинах / Гороховський Є.Ю., Єщенко Ю.В. ; заявник і власник Запорізький національний університет. – № u200701472 ; заявл. 12.02.2011 ; опубл. 27.08.2011, Бюл. № 13.
34. Петровская В.Г. Микрофлора человека в норме и патологии/ В.Г. Петровская, О.П. Марко. – М.: Медицина, 1976. – 263 с.
35. Пинегин Б.В. Дисбактериозы кишечника/ Б.В.Пинегин, В.Н. Мальцев, В.М.Коршунов. – М., 1984. – 144с.
36. Полесская О.Г. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде / О.Г. Полесская, Е.И. Каширина, Н.Д.Алехина // Физиология растений. – 2004. – Т. 51. – С. 686–691.
37. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва // М : МедиаСфера, 2002. – 320 с.
38. Торопцев И.В. Инкреторная функция поджелудочной железы / И.В. Торопцев, В.А. Ещенко. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1981. – 127 с.
39. Транслокация бактерий из желудочно–кишечного тракта – естественный защитный механизм / В.М. Никитенко Е.И. Ткаченко, А.Л. Стадников [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2004. – №1. – С. 48.
40. Трофимов А.В., К.И. Владимирович, Кветной И.М. Нейроэндокринные клетки

- желудочно-кишечного тракта в моделях преждевременного старения. Молекулярная нейроиммуноэндокринология. М : ДЕАН, 2005. – 205 с.
41. Феклисова Л.В. Применение лактосодержащих пробиотиков: оценка многолетнего использования Аципола в педиатрической практике / Л.В. Феклисова // *Consilium medicum. Педиатрия*. – 2007. – №2. – С. 123–127.
42. Франциенц Е. М. Перекисное окисление липидов в патогенезе заболеваний / Е. М. Франциенц, Ю. С. Сидоренко, Л. Я. Розенко / Ростов-на-Дону : Изд. Ростовского университета, 2005. – 175 с.
43. Холт Й.Г. Краткий определитель бактерий Берги / Й.Г. Холт. – М. : Мир, 1980. – 495 с.
44. Щербань Н.Г. Влияние мелатонина на метаболизм оксида азота и активность супероксиддисмутазы при воспалении в эксперименте / Н.Г. Щербань // *Питання експериментальної та клінічної медицини. Збірник статей*. – 2012. – Т. 4, № 15. – С.104–110.
45. Эпштейн-Литвак Р.В. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника: методические рекомендации / Р.В. Эпштейн-Литвак. – М., 1977. – 86 с.
46. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления / Д.С. Янковский. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
47. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis / F. Niyonsaba, K. Iwabuchi, A. Someya [et al.] // *Immunology*. – 2002. – V. 106, №1. – P. 20–26.
48. A critical role for increased labile zinc in reducing sensitivity of cultured sheep pulmonary artery endothelial cells to LPS-induced apoptosis / K. Thambiayya, K.J. Wasserloos, V.E. Kagan [et al.] // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2012. – V. 302, №12. – P. 1287–1295.
49. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells / K. Cadwell, J.Y. Liu, S.L. Brown [et al.] // *Nature*. – 2008. – V. 456, № 7219. – P. 259–263.

50. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease / S. K. Mazmanian, J. L. Round, D. L. Kasper // *Nature*. – 2008. – V. 453, № 7195. – P. 620–625.
51. A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease / C.G. Peterson, E. Eklund, Y. Taha [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – V.97, № 7. – P. 1755–1762.
52. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria / A.J. Macpherson, D. Gatto, F. Sainsbury [et al.] // *Science*. – 2000. – V. 288, № 5474. – P. 2222–2226.
53. A quantitative analysis of NSAID-induced small bowel pathology by capsule enteroscopy / L. Maiden, B. Thjodleifsson, A. Theodors [et al.] // *Gastroenterology*. – 2005. – V. 128, № 5. – P. 1172–1178.
54. A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling / M. Jaattela, H. Mouritzen, F. Elling, L. Bastholm // *J. Immunol.* – 1996. – V. 156, № 3. – P. 1166–1173.
55. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th 1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria / N. Kamada, T. Hisamatsu, S. Okamoto [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175, № 10. – P. 6900–6908.
56. Activation of Paneth Cell α -Defensins in Mouse Small Intestine / T. Ayabe, D.P. Satchell, P. Pesendorfer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, № 7. – P. 5219–5228.
57. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses / T.W. Hand, L.M. Dos Santos, N. Bouladoux [et al.] // *Science*. – 2012. – V. 337, № 6101. – P. 1553–1556.
58. Al-Sadi R.M. IL-1 β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability / R.M. Al-Sadi, T.Y. Ma // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178, №7. – P. 4641–4649.
59. Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress / Y. Qiao, J. Sun, Y. Ding [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – V. 97,

- № 4. – P. 1689-1697.
60. Andrews G.K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions / G.K. Andrews // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – V. 59, № 1. – P. 95–104.
61. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview / J.C. Hoffmann, N.N. Pawlowski, A.A. Kühl [et al.] // *Pathobiology.* – 2002-2003. – V. 70, №3. – P. 121-130.
62. Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation / C Lang, C Murgia, M Leong [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2007. – V. 292, № 2. – P. 577–584.
63. Antioxidant effect of zinc in humans / A.S. Prasad, B. Bao, F.W.J. Beck [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – V. 37, № 8. – P. 1182–1190.
64. Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease / V. Stojiljković, C. Todorović, S. Pejić [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2009. – V. 42, № 13-14. – P. 1431–1437.
65. Avery R.A., Bettger W.J. Zinc Deficiency Alters the Protein Composition of the Membrane Skeleton but not the Extractability or Oligomeric Form of Spectrin in Rat Erythrocyte Membranes / R.A. Avery, W.J. Bettger // *J. Nutr.* – 1992. – V. 122, № 3. – P. 428–434.
66. B cell-intrinsic MyD88 signaling prevents the lethal dissemination of commensal bacteria during colonic damage // D. Kirkland, A. Benson, J. Mirpuri [et al.] // *Immunity.* – 2012. – V. 36, № 2. – P. 228–238.
67. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model / M.E. Johansson, J.K. Gustafsson, K.E. Sjöberg, [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – V. 5, № 8. – P. 12238–12246.
68. Bacterial β -glucuronidase inhibition protects mice against enteropathy induced by indomethacin, ketoprofen or diclofenac: mode of action and pharmacokinetics / K.S. Saitta, C. Zhang, K.K. Lee [et al.] // *Xenobiotica.* – 2014 – V. 44, № 1 – P. 28–35.
69. Bajait C. Role of zinc in pediatric diarrhea / C. Bajait, V. Thawani // *Indian J. Pharmacol.* – 2011. – V. 43, № 3. – P. 232–235.
70. Balfour R.B. Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases // R.B. Sartor,

- S.K. Mazmanian // *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* – 2012. – № 1. – P. 15–21.
71. Balish E. *Enterococcus faecalis* Induces Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10 Knockout Mice / E. Balish, T. Warner // *Am. J. Pathol.* – 2002. – V. 160, № 6. – P. 2253–2257.
72. Barenfanger J. Interpretation of Gram Stains for the Nonmicrobiologist / J. Barenfanger, C.A. Drake // *LabMedicine.* – 2001. – V. 32, № 7. – P. 368–375.
73. Barker N. The intestinal stem cell / N. Barker, M. Wetering, H. Clevers // *Genes Dev.* – 2008. – V. 22, № 14. – P. 1856–1864.
74. Barrios J.M. Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and nsaid injury of the ileal mucosa in rats / J.M. Barrios, L. M. Lichtenberger // *Gastroenterology.* – 2000. – V. 118, № 6. – P. 1179–1186.
75. Baureder M. Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis* / M. Baureder, R. Reimann, L. Hederstedt // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – V. 331, №2. – P. 160–164.
76. Beisner J. Disclosures Innate Antimicrobial Immunity in Inflammatory Bowel Diseases / J. Beisner, F.S. Eduard, J. Wehkamp // *Expert. Rev. Clin. Immunol.* – 2010. – V. 6, № 5. – P. 809–818.
77. Bejarano E. Chaperone-Mediated Autophagy / E. Bejarano, A.M. Cuervo // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2010. – V. 7, № 1. – P. 29–39.
78. Bell S.G. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link / S.G. Bell, B.L. Vallee // *Chembiochem.* – 2009. – V. 5, №101. – P. 55–62.
79. Bergman B. The variation with age of tissue zinc concentrations in albino rats determined by atomic absorption spectrophotometry / B. Bergman, R. Sjostrom, K.R. Wing // *Acta Physiol. Scand.* – 1974. – V. 92, № 4. – P. 440–450.
80. Besecker B.Y. A comparison of zinc metabolism, inflammation, and disease severity in critically ill infected and noninfected adults early after intensive care unit admission / Besecker BY, Exline MC, Hollyfield J, [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2011. – V. 93, №6. – P. 1356–1364.
81. Bevins C.L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity / C.L. Bevins // *Biochem. Society Transactions.* – 2006. – V. 34, № 2. – P. 263–266.

82. Bevins C.L. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract // C.L. Bevins, E.M. Porter, T. Ganz // *Gut*. – 1999. – V. 45, № 6. – P. 911–915.
83. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate / S. Fukuda, H. Toh, K. Hase [et al.] // *Nature*. – 2011. – V. 469, № 7331. – P. 543–547.
84. Bjarnason I. Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy / I. Bjarnason, K. Takeuchi // *J. Gastroenterol.* – 2009. – V. 44, № 19. – P. 23–29.
85. Boelsterli U.A. Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: underlying mechanisms and novel strategies / U.A. Boelsterli, M.R. Redinbo, K.S. Saitta // *Toxicol. Sci.* – 2013. – V. 131, № 2. – P. 654–667.
86. Boman H.G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity / H.G. Boman // *Cell*. – 1991. – V. 65, № 2. – P. 205–207.
87. Brennan F.M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease / F.M. Brennan, R.N. Maini, M. Feldmann // *Br. Med. Bull.* – 1995. – V. 51, № 2. – P. 368–384.
88. Buffinton G.D. Altered ascorbic acid status in the mucosa from inflammatory bowel disease patients / G.D. Buffinton, W.F. Doe // *Free Radic. Res.* – 1995. – V. 22, № 2. – P. 131–143.
89. Butler A. Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms / A. Butler // *Science*. – 1998. – V. 281, № 5374. – P. 207–209.
90. Cadmium-Induced Enteropathy in Domestic Cocks: A Biochemical and Histological Study after Subchronic Exposure / N. Berzina, J. Markovs, S. Isajevs [et al.] // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2007. – V. 101, № 1. – P. 29–34.
91. Cadmium-induced enteropathy: comparative toxicity of cadmium chloride and cadmium-thionein / L.S. Valberg, J. Haist, M.G. Cherian [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 1977. – V. 2, № 4. – P. 963–975.
92. Carbon disulfide mediated protein cross-linking by N,N-diethyldithiocarbamate / W.M. Valentine, V. Amarnath, K. Amarnath [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 1995. – V. 8, № 1. – P. 96–102.
93. Catalioto R.M. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible

- therapeutical interventions / R.M. Catalioto, C.A. Maggi, S. Giuliani // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – V. 18, № 3. – P. 398–426.
94. Cell and tissue responses to oxidative damage / Y.M.W. Janssen, B. van Houten, P.J.A. Borm [et al.] // *Lab. Invest.* – 1993. V. 69, № 3 – P. 261–274.
95. Cellular and Molecular Biology of Metals / [R.K. Zalups, D.J. Koropatnick, ed.]. – New York : CRC Press, 2010. – 440 p.
96. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease / C. Neut, P. Bulois, P. Desreumaux [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – V. 97, № 4. – P. 939–946.
97. Chausmer A.B. Zinc, Insulin and Diabetes / A.B. Chausmer // *Journal of the American College of Nutrition.* – 1998. – V. 17, № 2. – P. 109–115.
98. Chavakis T. Molecular mechanisms of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins / T. Chavakis, A.E. May, K.T. Preissner [et al.] // *Blood.* – 1999. – V. 93, № 9. – P. 2976–2983.
99. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease / N.J. Simmonds, R.E. Allen, T.R. Stevens [et al.] // *Gastroenterology.* – 1992. – V. 103, № 1. – P. 186–196.
100. Cherian MG. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis / M.G. Cherian, A. Jayasurya, B.H. Bay // *Mutat. Res.* – 2003. – V. 533, № 201. – P. 9.
101. Cho J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease / J.H. Cho // *Nature Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8, № 6. – P. 458–466.
102. Chowanadisai W. Identification of a mutation in SLC30A2 (ZnT-2) in women with low milk zinc concentration that results in transient neonatal zinc deficiency // W. Chowanadisai, B. Lonnerdal, S.L. Kelleher // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281, № 51. – P. 39699–39707.
103. Circu M.L. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – V. 48, № 6. – P. 749–762.
104. Clarke L.L. Abnormal Paneth cell granule dissolution and compromised resistance to bacterial colonization in the intestine of CF mice / L.L. Clarke, L.R. Gawenis,

- E.M. Bradford [et al] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2004. – V. 286, № 6. – P. 1050–1058.
105. Clayburgh D.R. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease / D.R. Clayburgh, L. Shen, J.R. Turner // *Lab. Invest.* – 2004. – V. 84, № 3. – P. 282–291.
106. Clinical trial: the effects of a probiotic mixture on non-steroidal anti-inflammatory drug enteropathy—a randomized, double-blind, cross-over, placebo-controlled study / M. Montalto, A. Gallo, V. Curigliano [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2010. – V. 32, № 2. – P. 209–214.
107. Commensal-Induced Regulatory T Cells Mediate Protection against Pathogen-Stimulated NF- κ B Activation / C. O'Mahony, P. Scully, D. O'Mahony [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4, № 8. – P. 112–124.
108. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine / A.J. Fabich, S.A. Jones, F.Z. Chowdhury [et al.] // *Infect. Immun.* – 2008. – V. 76, № 3. – P. 1143–1152.
109. Conaghan P.G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity / P.G. Conaghan // *Rheumatology International.* – 2012. – V. 32, № 6. – P. 1491–1502.
110. Copper and zinc status during acute inflammation: studies on blood, liver and kidneys metal levels in normal and inflamed rats / R. Milanino, A. Cassini, A. Conforti [et al.] // *Agents Actions.* – 1986. – V. 19, № 3–4. – P. 215– 223.
111. Copper and zinc status in rats with acute inflammation: focus on the inflamed area // R. Milanino, M. Marrella, U. Moretti [et al.] // *Agents Actions.* – 1988. – V. 22, № 3–4. – P. 356– 364.
112. Costello L.C. Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone / L.C. Costello, Y. Liu, J. Zou [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1999. – V. 274, № 25. – P. 17499–17504.
113. Cousins R.J. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals / R.J. Cousins, J.P. Liuzzi, L.A. Lichten // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281, № 34. – P. 24085–24089.
114. Cousins R.J. Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein

- genes by interleukin 1 / R.J. Cousins and A.S. Leinart // *FASEB J.* – 1988. – V. 2, № 13. – P. 2884–2890.
115. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells / S. Lala, Y. Ogura, C. Osborne [et al.] // *Gastroenterology.* – 2003. – V. 125, №1. – P. 47–57.
116. Cui L. The permissive effect of zinc deficiency on uroguanylin and inducible nitric oxide synthase gene upregulation in rat intestine induced by interleukin 1alpha is rapidly reversed by zinc repletion / L. Cui, R.K. Blanchard, R.J. Cousins // *J. Nutr.* – 2003. – V. 133, № 1. – P. 51–56.
117. Cunliffe R.N. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract / Cunliffe R.N., Mahida1 Y.R. // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – V. 75, № 1. – P. 49–58.
118. Curcumin protects intestinal mucosal barrier function of rat enteritis via activation of MKP-1 and attenuation of p38 and NF- κ B activation / W.B. Song, Y.Y. Wang, F.S. Meng [et al.] // *PLoS One.* – 2010. –V. 5, № 9. – P. 12969–12978.
119. Davies N.M. Detection and prevention of NSAID-induced enteropathy / N.M. Davies, J.Y. Saleh, N.M. Skjodt // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* – 2000. – V. 3, № 1. – P. 137–155.
120. Davis S.R. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function / S.R. Davis, R.J. Cousins // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130, № 5. – P. 1085–1088.
121. De S.K. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression / S.K. De, M.T. McMaster, G.K. Andrews // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265, № 25. – P. 15267–15274.
122. Degranulation of Paneth cells via Toll-like receptor / C. Rumio, D. Besusso, M. Palazzo [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2004. – V. 165, №2. – P. 373–381.
123. Deletion of the mouse Slc30a8 gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion / L.D. Pound, S.A. Sarkar, R.K. Benninger [et al.] // *Biochem. J.* – 2009. – V. 421, № 3. – P. 371–376.
124. Derelanko M.J. Effects of corticosteroids on indomethacin-induced intestinal ulceration in the rat / M.J. Derelanko, J.F. // *Long. Dig. Dis. Sci.* – 1980. – V. 25, № 11. – P. 823–829.

125. Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice / S. Kitajima, M. Morimoto, E. Sagara [et al.] // *Exp. Anim.* – 2001. – V. 50, № 5. – P. 387–395.
126. Distribution of small intestinal mucosal injuries as a result of NSAID administration / S. Fujimori, K. Gudis, Y. Takahashi [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2010. – V. 40, № 6. – P. 504–510.
127. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells / R. Schreck, B. Meier, D.N. Mannel [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 175, № 5. – P. 1181–1194.
128. Drug enterocyte adducts: Possible causal factor for diclofenac enteropathy in rats / C.R. Atchison, A.B. West, A. Balakumaran [et al.] // *Gastroenterology.* – 2000. – V. 119, № 6. – P. 1537–1547.
129. Dunnick J.K. Toxicity studies of amphetamine sulfate, ampicillin trihydrate, codeine, 8-methoxypsoralen, α -methyl dopa, penicillin VK and propantheline bromide in rats and mice / Dunnick J.K., Elwell M.R. // *Toxicology.* – 1989 – V. 56, № 2. – P. 123–136.
130. Economou M. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations / M. Economou, G. Pappas // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2008. – V. 14, № 5. – P. 709-720.
131. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis / A.D. Fox, S.A. Kripke, J. De Paula [et al.] // *J. Parenter. Enteral. Nutr.* – 1988 – V. 12, № 4. – P. 325–331.
132. Effect of indomethacin on bile acid-phospholipid interactions: implication for small intestinal injury induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs / Y. Zhou, E.J. Dial, R. Doyen, L. M. Lichtenberger // *Am. J. Physiol.—Gastrointest. Liver Phys.* – V. 298, № 5. – P. 722–731.
133. Effects of diethyldithiocarbamate on activating mechanisms of neutrophils. / Y. Izumi, K. Ogino, T. Murata [et al.] // *Pharmacol. Toxicol.* – 1994. – V. 74, №4–5. – P. 280–286.
134. Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro / E. Cario, S. Jung, J.D. Harder [et al.] // *Europ. J. Clin. Invest.* – 2000. – V. 30, № 5.

- P. 419–428.
135. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis / J. Cao, J.A. Bobo, J.P. Liuzzi, R.J. Cousins // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – V. 70, № 4. – P. 559–566.
136. Efficacy of *Lactobacillus casei* treatment on small bowel injury in chronic low-dose aspirin users: a pilot randomized controlled study / H. Endo, T. Higurashi, K. Hosono [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 2011. – V. 46, № 7. – P. 894–905.
137. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology / N.H. Salzman, K. Hung, D. Haribhai [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2010. – V. 11, № 1. – P. 76–83.
138. Ercal N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage / N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2001. – V. 1, № 6. – P. 529-539.
139. Erl W. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} / W. Erl, C. Weber, G. K. Hansson // *Am. J. Phys. – Cell Physiology.* – 2000. – V. 278, № 6. – P. 1116-1125.
140. *Escherichia coli* K5 capsule expression enhances colonization of the large intestine in the gnotobiotic rat / M.V. Herias, T. Midtvedt, L.A. Hanson, A.E. Wold // *Infect. Immun.* – 1997. – V. 65, № 2. – P. 531–536.
141. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock / E.A. Deitch, D. Xu, L. Franko [et al] // *Shock.* – 1994. – V. 1, № 2. – P. 141–146.
142. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis / Y. Ogura, S. Lala, W. Xin [et al.] // *Gut.* – 2003. – V. 52, № 11. – P. 1591–1597.
143. Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of an intracellular bacterial infection / T.J. Break, S. Jun, M. Indramohan [et al.] // *J. Immunol.* – 2012. – V. 188, №7. – P. 3342–3350.
144. Fasano A. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins / A. Fasano, J.P. Nataro // *Adv. Drug Deliv Rev.* – 2004. – V. 56, №6. – P. 795–807

145. Folsom A.N. Zinc as a modulator of chronic, inflammatory intestinal disorders with a focus on celiac disease, inflammatory bowel syndrome and Crohn's disease / A.N. Folsom, K.N. Gwin, J.Z. Ilich // *J. Nutr. Food Sci.* – 2012. – № 2. – P. 116.
146. Foote J.W. Albumin bound and alpha 2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults / J.W. Foote, H.T. Delves // *J Clin Pathol.* – 1984. – V.37, №9. – P. 1050–1054.
147. Fox M.R. Nutritional influences on metal toxicity: cadmium as a model toxic element / M.R. Fox // *Environ. Health Perspect.* – 1979. – № 29. – P. 95–104.
148. Fraker P.J. Roles for Cell Death in Zinc Deficiency / P.J. Fraker // *Journal of Nutrition.* – 2005. – V. 135, № 3. – P. – 359–362.
149. Frederickson C.J. Importance of Zinc in the Central Nervous System: The Zinc-Containing Neuron / C.J. Frederickson, S.W. Suh, D. Silva [et al.] // *Journal of Nutrition.* – 2000. – V. 130, № 5. – P. 1471 –1483.
150. Frederickson C.J. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons / C.J. Frederickson // *International review of neurobiology.* – 1989. – V. 31. – P. 145–238.
151. Functional role of intracellular labile zinc in pulmonary endothelium / K. Thambiayya, A.M. Kaynar, C. Croix, B.R. Pitt // *Pulm. Circ.* – 2012. – V. 2, № 4. – P. 442–451.
152. Gad S.C. Toxicology of the Gastrointestinal Tract / S.C. Gad. – Boca Raton : CRC Press, 2007 – 376 p.
153. Geboes K. Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation / K. Geboes, I. Dalle // *Gut.* – 2002. – V. 50, № 3. – P. 37–42.
154. Generation and characterization of mice lacking the zinc uptake transporter ZIP3 / J. Dufner-Beattie, Z.L. Huang, J. Geiser [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – V. 25, № 13. – P. 5607–5615.
155. Giles P.J. Hormonal Regulation of Zinc Metabolism in a Human Prostatic Carcinoma Cell Line (PC-3) / P.J. Giles, R.J. Cousins // *Cancer Research.* – 1982. – V. 42, № 1. – P. 2–7.
156. Goh J. Review article: nutrition and adult inflammatory bowel disease / J. Goh,

- C.A. O'Morain // *Alim. Pharmacol. Therap.* – 2003. – V. 17, № 3. – P. 307–320.
157. Gotteland M. Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans / M. Gotteland, S. Cruchet, S. Verbeke // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2001. – V. 15, № 1. – P. 11–17.
158. Gregory D.S. The prediction and characterization of metal binding sites in proteins / D.S. Gregory, A.C.R. Martin, J. C. Cheetham [et al] // *Prote. Eng.* – 1993. – V. 6, № 1. – P. 29–35.
159. Guarner F. Gut flora in health and disease / F. Guarner, J.R. Malagelada // *Lancet.* – 2003. – V. 361, № 9356. – P. 512–519.
160. Gudmundsson G.H. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system / G.H. Gudmundsson, B. Agerberth // *J. Immunol. Methods.* – 1999. – V. 232, № 1–2. – P. 45–54.
161. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease / D. Jenkins, M. Balsitis, S. Gallivan [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 1997. – V. 50, № 2. – P. 93–105.
162. Gustafsson B.I. Effects of indomethacin on non-adrenergic, non-cholinergic motility of stomach and small intestine / B.I. Gustafsson, D.S. Delbro // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988. – V. 147, № 1. P. 67–72.
163. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella* / S.E. Winter, P. Thiennimitr, M.G. Winter [et al.] // *Nature.* – 2010. – V. 467, № 7314. – P. 426–429.
164. Gyorkey F. Zinc and Magnesium in Human Prostate Gland: Normal, Hyperplastic, and Neoplastic / F. Gyorkey, K.-W. Min, J.A. Huff [et al] // *Cancer Res.* – 1967. – V. 27, № 1. – P. 1348–1353.
165. Haase H. Differential gene expression after zinc supplementation and deprivation in human leukocyte subsets / H. Haase, D.J. Mazzatti, A. White [et al.] // *Mol. Med.* – 2007. – V. 13, № 7–8. – P. 362–370.
166. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? / B. Halliwell // *Lancet.* – 1994. – V. 344, № 8924 – P. 721–724.
167. Hambidge M. Human Zinc Deficiency / M. Hambidge // *J. Nutr.* – 2000, V. 130,

- № 5. – P. 1344–1349.
168. Hayden M.S. Shared principles in NF-kappaB signaling / M.S. Hayden, S. Ghosh // *Cell*. – 2008. – V. 132, № 3. – P. 344–362.
169. Hennig B. Zinc Deficiency Alters Barrier Function of Cultured Porcine Endothelial Cells / B. Hennig, Y. Wang, S. Ramasamy [et al.] // *J. Nutr.* – 1992. – V. 122, № 6. – P. 1242–1247.
170. Homsher R. Spectrophotometric Investigation of sensitive complexing agents for the determination of zinc in serum / R. Homsher, B. Zak // *Clinical chemistry*. – 1985 – V. 31, № 8. – P. 1310–1313.
171. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease / N. Inohara, Y. Ogura, A. Fontalba [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. V. 278, № 8. – P. 5509–5512.
172. Huang L. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse / L Huang, J. Gitschier // *Nat. Genet.* – 1997. – V. 17, № 3. – P. 292–297.
173. Hugot J.-P. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease / J.-P. Hugot, C. Chamaillard, H. Zouali [et al.] // *Nature*. – V. 411, № 6837. – P. 599–603.
174. Hujanen E.S. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro / E.S. Hujanen, S.T. Seppä, K. Virtanen // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1995. – V. 1245, № 2. – P. 145–152.
175. Hunter C.J. Enterobacter sakazakii enhances epithelial cell injury by inducing apoptosis in a rat model of necrotizing enterocolitis / C.J. Hunter, V.K. Singamsetty, N.K. Chokshi [et al.] // *J. Inf. Dis.* – 2008. – V. 198, № 4. – P. – 586-593.
176. Huycke M.M. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA / M.M. Huycke, V. Abrams, D.R. Moore // *Carcinogenesis*. – 2002. – V. 23, № 3. – P. 529–536.
177. Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica / S. Kury, B Dreno, S. Bezieau [et al.] // *Nat Genet.* – 2002. – V. 31, № 3. – P. 239–240.
178. Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure / C. Haton, A. Francois, M. Vandamme [et al.] // *Rad. Res.* – 2007.

- V. 167, № 4. – P. 445–453.
179. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease / L. Kruidenier, I. Kuiper, W. Van Duijn [et al.] // *J Pathol.* – 2003. – V. 201, № 1. – P. 17–27.
180. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis / J. Petersson, O. Schreiber, G.C. Hansson [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2010. – V. 300, № 2. – P. 327–333.
181. In vitro and in vivo actions of zinc ion affecting cellular substances which influence host metabolic responses to inflammation / C.A. Mapes, P.T. Bailey, C.F. Matson [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 1978. – V. 95, № 1. – P. 115–124.
182. In vitro and in vivo protection against indomethacin-induced small intestinal injury by proton pump inhibitors, acid pump antagonists, or indomethacin-phosphatidylcholine / Y.J. Lim, T.M. Phan, E.J. Dial [et al.] // *Digestion.* – 2012. – V. 86, № 2. – P. 171–177.
183. Increased rate of spontaneous bacterial peritonitis among cirrhotic patients receiving pharmacologic acid suppression / G.A. Goel, A. Deshpande, R. Lopez [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – V. 10, № 4. – P. 422–427.
184. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties / D.W. Gilroy, P.R. Colville-Nash, D. Willis [et al.] // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5, № 6. – P. 698–701.
185. Induction of intestinal Th 17 cells by segmented filamentous bacteria / I.I. Ivanov, K. Atarashi, N. Manel [et al.] // *Cell.* – V. 139, № 3. – P. 485–498.
186. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat / J. Galvez, M. Garrido, M. Merlos [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – V. 130, № 8. – P. 1949–1959.
187. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation / J. Berkes, V.K. Viswanathan, S.D. Savkovic [et al.] // *Gut.* – 2003. – V. 52, № 3. – P. 439–451.
188. Intestinally secreted C-type lectin Reg3p attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice / M.T. van Ampting, L.M. Loonen, A.J. Schonewille [et al.] // *Infect. Immun.* – 2012. – V. 80, № 3. – P. 1115–1120.

189. Islet bold beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells / H. Ishihara, P. Maechler, A. Gjinovci [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2003. – V. 5, № 4. – P. 330–335.
190. Johnston R.B. Elaboration of toxic oxygen by-products by neutrophils in a model of immune complex disease / R.B. Johnston, J.E.Lehmeyer // *J. Clin. Invest.* – 1976. – V. 57, № 4. – P. 836–41.
191. Kadam S.S. Principles of medicinal chemistry / Kadam S.S. – Delhi : Pragati Books Pvt. Ltd., 2007. – 463 p.
192. Kallikrein-kininogen system activation and bradykinin (B2) receptors in indomethacin induced enterocolitis in genetically susceptible Lewis rats / A. Stadnickia, R.B. Sartorc, R. Janardhamc [et al.] // *Gut* – 1998. – V. 43, № 3. – P. 365–374.
193. Kent T.H. Small intestinal ulcers and intestinal flora in rats given indomethacin / T.H. Kent, R.M. Cardelli, F.W. Stamler // *Am. J. Pathol.* – 1969. – V. 54, № 2. – P. 237–249.
194. Keshav S. Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine / S. Keshav // *J. Leukocyte Biol.* – 2006. – V. 80, № 3. – P. 500–508.
195. King J.C. Assessment of zinc status / J.C. King // *J. Nutr.* – 1990. – V. 120, № 11. – P. 1474–1479.
196. Kirberger M.P. Analyses and Applications of Metalloprotein Complexes / M.P. Kirberger. – Georgia : Georgia State University, 2008. – 190 p.
197. Kleiveland C.R. Human mesenchymal stem cell proliferation is regulated by PGE2 through differential activation of cAMP-dependent protein kinase isoforms / C.R. Kleiveland, M. Kassem, T. Lea // *Exp. Cell. Res.* – 2008. – № 314. – P. 1831–1838.
198. Kobayashi A. Protein-Losing Enteropathy Associated With Arsenic Poisoning / A. Kobayashi, Y. Ohbe // *Am. J. Di.s Child.* – 1971. – V. 121, № 6. – P. 515–517.
199. Kohen R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification / R. Kohen, A. Nyska // *Toxicol. Pathol.* – 2002. – V. 30, № 6. – P. 620–650.

200. Kraus A. Supplementation with Vitamin C, Vitamin E or β -Carotene Influences Osmotic Fragility and Oxidative Damage of Erythrocytes of Zinc-Deficient Rats / A. Kraus, H.-P. Roth, M. Kirchgessner // *J. Nutr.* – 1997. – V. 127, № 7. – P. 1290–1296.
201. Kruidenier L. Antioxidants and mucosa protectives: realistic therapeutic options in inflammatory bowel disease? / L. Kruidenier, H.W. Verspaget // *Mediators Inflamm.* – 1998. – V. 7, № 3. – P. 157–162.
202. Kruidenier L. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? / L. Kruidenier, H.W. Verspaget // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2002. – V. 16, № 12. – P. 1997–2015.
203. Kumar A. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species / A. Kumar // *EMBO J.* – 2007. – V. 26, № 21. – P. 4457–4466.
204. *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells / M. Montalto, N. Maggiano, R. Ricci [et al.] // *Digestion.* – 2004. – V. 69, № 4. – P. 225–228.
205. *Lactobacillus rhamnosus* GG exacerbates intestinal ulceration in a model of indomethacin-induced enteropathy / R. Kamil, M.S. Geier, R.N. Butler, G.S. Howarth // *Dig. Dis. Sci.* – V. 52, № 5. – P. 1247–1252.
206. Lanas A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications / A. Lanas, F. Sopena // *Gastroenterol. Clin. North. Am.* – 2009. – V. 38, № 2. – P. 333–352.
207. Lange S. Evans blue permeation of intestinal mucosa in the rat / S. Lange, D.S. Delbro, E. Jennische // *Scand J Gastroenterol.* – 1994. – V. 29, № 1. – P. 38–46.
208. Lanke K. PDTC inhibits picornavirus polyprotein processing and RNA replication by transporting zinc ions into cells // K. Lanke, B.M. Krenn, W.J. Melchers [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2007. – V. 88, № 4. – P. 1206–1217.
209. Lawrence T. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation / T. Lawrence, D.W. Gilroy, P.R. Colville-Nash // *Nat. Med.* – 2001. – V. 7, № 12. – P. 1291–1297.

210. Lazo J.S. Metallothioneins and cell death by anticancer drugs / J.S. Lazo, B.R. Pitt // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1995. – V. 35. – P. 635–653.
211. Le Bouguenec C. Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria / C. Le Bouguenec, C. Schouler // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010. – V. 301, № 1. – P. 1–6.
212. Leitzmann M.F. Zinc Supplement Use and Risk of Prostate Cancer / M.F. Leitzmann, M.J. Stampfer, K. Wu, [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2003. – V. 95, № 13. – P. 1004–1007.
213. Lichten LA. Mammalian zinc transporters: Nutritional and physiologic regulation / L.A. Lichten, R.J. Cousins // *Annu. Rev. Nutr.* – 2009. – V. 29. – P.153–176.
214. Lichtenberger L.M. Association of phosphatidylcholine and nsaid as a novel strategy to reduce gastrointestinal toxicity / L.M. Lichtenberger, M. Barron, U. Marathi // *Drugs of Today.* – V. 45, № 12. – P. 877–890.
215. Lim Y.J. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Enteropathy / Y.J. Lim, C.-H. Yang // *Clin. Endosc.* – 2012. – V. 45, № 2. – P. 138–144.
216. Lin P.W. Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation / P.W. Lin // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 47, № 8. – P. 1205–1211.
217. Lin P.W. Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response / P.W. Lin, P.O. Simon, A.T. Gewirtz [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, № 19. – P. 19902–19907.
218. Liuzzi J.P. Mammalian zinc transporters / J.P. Liuzzi, R.J.Cousins // *Annu. Rev. Nutr.* – 2004. – V. 24. – P. 151–172.
219. Long-term effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective agents on the small bowel: a cross-sectional capsule enteroscopy study / L. Maiden, B. Thjodleifsson, A. Seigal [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – V. 5, № 9. – P. 1040–1045.
220. Lower gastrointestinal events in a double-blind trial of the cyclo-oxygenase-2 selective inhibitor etoricoxib and the traditional nonsteroidal anti-inflammatory drug

- diclofenac / L. Laine, S.P. Curtis, M. Langman [et al.] // *Gastroenterology*. – 2008. – V. 135, № 5. – P. 1517–1525.
221. Mager M. The histochemical detection of zinc / M. Mager, W.F. McNary, F. Lionetti // *J. Histochem. Cytochem.* – 1953. – V. 1, № 6. – P. 493–504.
222. Maiden L. Capsule endoscopic diagnosis of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced enteropathy / L. Maiden // *J. Gastroenterol.* – 2009. – V. 44, № 19. – P. 64–71.
223. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells / J. Lee, J.H. Mo, K. Katakura [et al.] // *Nature Cell Biol* – 2006. – V. 8, № 12. – P. 1327– 1336.
224. Maret W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein / thionein pair / W.Maret // *J. Nutr.* – 2003. – V. 133, №5. – P. 1460–1462.
225. Maret W. Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein / W. Maret, C. Jacob, B.L. Vallee [et al] // *Biochemistry*. – 1999. – V. 96, № 5. – P. 1936–1940.
226. Mathan M. The morphogenesis of the human Paneth cell: An Immunocytochemical ultrastructural study / M. Mathan, J. Hughes, R. Whitehead // *Histochemistry*. – 1987. – V. 87, № 1. – P. 91–96.
227. Matsui T. Zinc deficiency in Crohn's disease / T. Matsui // *J. Gastroenterol.* – 1998. – V. 33, № 6. – P. 924–925.
228. Mazmanian S.K. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease / S.K. Mazmanian, J.L. Round, D.L.Kasper // *Nature*. – 2008. – V. 453, № 7195. – P. 620–625.
229. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin / T. Yamada, E. Deitch, R.D. Specian , M. A. Perry // *Inflammation*. – 1993. – V. 17, № 6. – P. 641–662.
230. Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice / P.L. Beck, R. Xavier, N. Lu [et al.] // *Gastroenterology*. – 2000. – V. 119, № 3. – P. 699– 705.
231. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response / R. Medzhitov // *Nature*. – 2007. – V. 449, № 7164. – P. 819–826.

232. Metallothionein: the multipurpose protein / P. Coyle, J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe // *Cel. Mol. Life Sci.* – 2002. – V. 59, № 4. – P. 627–647.
233. Metronidazole reduces intestinal inflammation and blood loss in non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy / I. Bjarnason, J. Hayllar, P. Smethurst [et al.] // *Gut.* – 1992. – V. 33, № 9. – P. 1204–1208.
234. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX3CR1 cells / G.E. Diehl, R.S. Longman, J.X. Zhang // *Nature.* – 2013. – V. 494, № 7435. – P. 116–120.
235. Misoprostol reduces indomethacin-induced changes in human small intestinal permeability / I. Bjarnason, P. Smethurst, C.G. Fenn [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 1989. – V. 34, № 3. – P. 407–411.
236. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease / A. Mizoguchi // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2012. – № 105. – 263–320.
237. Molodecky N.A. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review / N.A. Molodecky, I.S. Soon, D.M. Rabi [et al.] // *Gastroenterology.* – 2012. – V. 142, № 1. – P. 46–54.
238. Mouse Paneth cell secretory responses to cell surface glycolipids of virulent and attenuated pathogenic bacteria / H. Tanabe, T. Ayabe, B. Bainbridge [et al.] // *Infect. Immun.* – 2005. – V. 73, № 4. – P. 2312–2320.
239. Moy T.I. Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium* / T.I. Moy, E. Mylonakis, S.B. Calderwood, F.M. Ausubel // *Infect. Immun.* – 2004. – V. 72, №8. – P. 4512–4520.
240. Mucin dynamics and enteric pathogens / M.A. McGuckin, S.K. Lindén, P. Sutton, T.H. Florin // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – V. 9, № 4. – P. 265–278.
241. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls / B. Kleessen, A.J. Kroesen, H.J. Buhr, M. Blaut // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2002. – V. 37, № 9. – P. 1034–1041.
242. Mucosal flora in inflammatory bowel disease / A. Swidsinski, A. Ladhoff, A. Pernthaler [et al.] // *Gastroenterology.* – 2002. – V. 122, № 1. – P. 44–54.
243. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII and protect mice

- against intestinal *Listeria monocytogenes* infection // K. Brandi, G. Plitas, B. Schnabl [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – V. 204, № 8. – P. 1891–1900.
244. Neutrophil migration into indomethacin induced rat small intestinal injury is CD11a/CD18 and CD11b/CD18 co-dependent / A.W. Stadnyk, C. Dollard, T.B. Issekutz, A.C. Issekutz // *Gut.* – 2002. V. 50, № 5. – P. 629–635.
245. Neutrophil mucosal involvement is accompanied by enhanced local production of interleukin-8 in ulcerative colitis / Y. Raab, B. Gerdin, S. Ahlstedt, R. Hallgren // *Gut.* – 1993. – V. 34, № 9. – P.1203–1206.
246. Nicolson T.J. Insulin Storage and Glucose Homeostasis in Mice Null for the Granule Zinc Transporter ZnT8 and Studies of the Type 2 Diabetes–Associated Variants / T.J. Nicolson, E.A. Bellomo, N. Wijesekara // *Diabetes.* – 2009. – V. 58, № 9. – P. 2070–2083.
247. Nitric oxide mediated metallothionein induction by lipopolysaccharide / K. Arizono, S.I. Kagawa, H. Hamada, T. Ariyoshi // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* – 1995. – V. 90, № 1. – P. 49–58.
248. Nitric oxide release in response to gut injury / M.J. Miller, X.J. Zhang, H. Sadowska-Krowicka [et al.] // *Gastroenterol.* – 1993. – V. 28, № 2. – P. 149–154.
249. Niyonsaba F. Human β -defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor- α -treated human neutrophils / F. Niyonsaba, H. Ogawa, I. Nagaoka // *Immunology.* – 2004. – V. 111, № 3. – P. 273–281.
250. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense / L. Franchi, N. Kamada, Y Nakamura, [et al.] // *Nature Immunol.* – 2012. – V. 13, № 5. – P. 449–456.
251. NOD2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine / T. Petnicki-Ocwieja, T. Hrcir, Y.J. Liu [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106, № 37. – P. 15813–15818.
252. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent / T. Watanabe, K. Higuchi, A. Kobata [et al.] // *Gut.* – 2008. – V. 57, № 2. – P. 181–187.

253. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury / L.M. Lichtenberger, Z.M. Wang, J.J. Romero [et al.] // *Nature Medicine*. – 1995. – V. 1, № 2. – P. 154–158.
254. Nygaard S.C. Defensins reduce the barrier integrity of a cultured epithelial monolayer without cytotoxicity / S.C. Nygaard, T. Ganz, M. W.Peterson // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 1993. – V. 8, № 2. – P. 193–200.
255. O'Dell B.L. Role of Zinc in Plasma Membrane Function / B. L. O'Dell // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130, № 5. – P. 1432–1436.
256. Oette K. A highly sensitive method for measurement of lipid hydroperoxides by iodimetry and amperometric endpoint / K. Oette, M.L. Peterson , R.L. McAuley // *J. Lipid. Res.* – 1963. – № 4. – P. 212–215.
257. Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, *Znt5* / K. Inoue, K. Matsuda, M. Itoh, H. Kawaguchi [et al.] // *Hum Mol. Genet.* – 2002. – V. 11, № 15. – P. 1775–1784.
258. Ouellette A.J. Mucosal Immunity and Inflammation IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier / A.J. Ouellette // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1999. – V. 277, № 2. – P. 257–261.
259. Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response / P.W. Lin, P.O. Simon, A.T. Gewirtz, A.S. Neish // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, № 19. – P. 19902–19907.
260. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host–microbial interface / S. Vaishnava, C.L. Behrendt, A.S. Ismail [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105, № 52. – P. 20858–20863.
261. Papo N. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? / N Papo, Y. Shai // *Peptides*. – 2003. – V. 24, № 11. – P. 1693–1703.
262. Parkos C.A. Cell Adhesion and Migration. I. Neutrophil adhesive interactions with intestinal epithelium / C.A. Parkos // *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1997. – V. 273, № 4. – P. 763–768.

263. Patel M.A. Effects of ethanol extract of *Ficus bengalensis* (bark) on inflammatory bowel disease / M.A. Patel, P.K. Patel, M.B. Patel // *Indian J Pharmacol.* – 2010. – V. 42, № 4. – P. 214–218.
264. Paterson P.G. Effect of Dietary Zinc Deficiency on the Endogenous Phosphorylation and Dephosphorylation of Rat Erythrocyte Membrane / P.G. Paterson, O.B. Allen, W.J. Bettger // *J. Nutr.* – 1987. – V. 117, № 12. – P. 2096–2105.
265. Pearson E.J. Eosinophilic small bowel enteritis in response to folinic acid, fluorouracil, and oxaliplatin chemotherapy / E.J. Pearson, R. Mennel // *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* – 2013. – V. 26, № 3. – P. 288–289.
266. Peloquin J.M. The microbiota and inflammatory bowel disease: insights from animal models / J.M. Peloquin, D.D. Nguyen // *Anaerobe.* – 2013. – № 24. – P. 102–106.
267. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota / S.K. Lathrop, S.M. Bloom, S.M. Rao [et al.] // *Nature.* – 2011. – V. 478, № 7368. – P. 250–254.
268. Philcox J.C. Endotoxin-induced inflammation does not cause hepatic zinc accumulation in mice lacking metallothionein gene expression / J.C. Philcox, P. Coyle, A. Michalska [et al.] // *Biochem J.* – 1995. – V. 308, № 1. – P. 543–546.
269. Philcox J.C. Metallothionein in mice reduces intestinal zinc loss during acute endotoxin inflammation, but not during starvation or dietary zinc restriction / J.C. Philcox, M. Sturkenboom, P. Coyle [et al.] // *J Nutr.* - 2000. - V. 130, № 8. – P. 1901–1909.
270. Platz E.A. Selenium, Zinc, and Prostate Cancer / E.A. Platz, K.J. Helzlsouer // *Epidemiologic Reviews.* – 2001. – V. 23, № 1. – P. 93–101.
271. Prasad A.S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation / A.S. Prasad // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2009. – V. 12, № 6. – P. 646–652.
272. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease / A. Darfeuille-Michaud, C. Neut, N. Barnich [et al.] // *Gastroenterology.* – 1998. – V. 115, № 6. – P. 1405–1413.

273. Prevention and management of non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced small intestinal injury / S.C. Park, H.J. Chun, C.D. Kang, D. Sul // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – V. 17, № 42. – P. 4647–4653.
274. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small-intestinal injury by prostaglandin: a pilot randomized controlled trial evaluated by capsule endoscopy / S. Fujimori, T. Seo, K. Gudis [et al.] // *Gastrointestinal Endoscopy*, –2009. – V. 69, № 7. – P. 1339–1346.
275. Probiotics regulate the expression of COX-2 in intestinal epithelial cells / J.M. Otte, R. Mahjurián-Namari, S. Brand [et al.] // *Nutr Cancer.* – 2009. – V. 61, № 1. – P.103–113.
276. Prooxidant activity of the superoxide dismutase (SOD)-mimetic EUK-8 in proliferating and growth-arrested *Escherichia coli* cells / F. Matthijssens, P. Back, B.P. Braeckman, J.R. Vanfleteren // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – V. 45, № 5. – P. 708–715.
277. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration / R. Langenbach, S.G. Morham, H.F. Tiano [et al.] // *Cell.* – 1995. – V. 83, № 3. – P. 483– 492.
278. Proton pump inhibitors as a risk factor for recurrence of *Clostridium-difficile*-associated diarrhea / J.W. Kim, K.L. Lee, J.B. Jeong [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – V. 16, № 28. – P. 3573–3577.
279. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis / J.L. Wallace, S. Syer, E. Denou [et al.] // *Gastroenterology.* – 2011. – V. 141, № 4. – P. 1314–1322.
280. Pyrrolidine dithiocarbamate induces bovine cerebral endothelial cell death by increasing the intracellular zinc level / C.H. Kim, J.H. Kim, J. Xu [et al] // *J. Neurochem.* – 1999. – V. 72, N4. – P. 1586–1592.
281. Qi H.B. Effect of enterokinetic prucalopride on intestinal motility in fast rats / H.B. Qi, J.Y. Luo, X. Liu // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – V. 9 № 9. – P.2065–2067.
282. Quantitative analysis of NSAID-induced small bowel pathology by capsule

- enteroscopy / L. Maiden, B. Thjodleifsson, A. Theodors [et al.] // *Gastroenterology*. – 2005. – V. 128, № 5. – P. 1172–1178.
283. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis / S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, R. Eslami-Varzaneh [et al.] // *Cell*. – 2004. – V. 118, № 2. – P. 229–241.
284. Reduction of human defensin 5 affords a high-affinity zinc-chelating peptide / Y. Zhang, F.B. Cougnon, Y.A. Wanniarachchi, Hayden J.A. [et al.] // *ACS Chem. Biol.* – 2013. – V. 8, № 9. – P. 1907–1911.
285. Release of carbon disulfide is a contributing mechanism in the axonopathy produced by N,N-diethylthiocarbamate / J.D. Johnson, D.G. Graham, V. Amarnath [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1998. – V. 148, № 2. – P. 288–296.
286. Reuter B.K. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation / B.K. Reuter, N.M. Davies, J. L. Wallace // *Gastroenterology*. – 1997. – V. 112, № 1. – P. 109–117.
287. Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug / M. Uejima, T. Kinouchi, K. Kataoka [et al.] // *Microbiol. Immunol.* – 1996. – V. 40, № 8. – P. 553–560.
288. Role of prostaglandins in control of intestinal motility / P. Thor, J.W. Konturek, S.J. Konturek, J.H. Anderson // *Amer. J. Physiol.* – 1985. – V. 248, № 3. – P. 353–359.
289. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: Toxins, mediators, and modulators of gene expression / E.M. Conner, S.J. Brand, J.M. Davis [et al.] // *Infl. Bowel Dis.* – 1996. – V. 2, № 2. – P. 133–147.
290. Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage / K. Takeuchi, A. Tanaka, S. Kato [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2010. – V. 411, № 7–8, P. 459–466.
291. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats / A. Konaka, S. Kato, A. Tanaka [et al.] // *Pharm. Res.* – 1999. – V. 40, № 6. – P. 517–524.
292. Sandow M.J. The Paneth cell / M.J. Sandow, R. Whitehead // *Gut*. – 1979. – №20. – P. 420–431.

293. Sartor RB. Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease / RB. Sartor // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2001. – V. 17, № 4. – P. 324–330.
294. Sato M. Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in rat tissues // *Intern. J. Immunopharmacol.* – 1994. – V. 16, № 2. – P. 187–195.
295. Sato T. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts / T. Sato, J.H. van Es, H.J. Snippert [et al] // *Nature.* – 2011. – V. 469, № 7330. – P. 415–418
296. Satoh Y. Effect of live and heat-killed bacteria on the secretory activity of Paneth cells in germ-free mice / Y. Satoh // *Cell Tissue Res.* – 1988. – V. 251, № 1. – P. 87–93.
297. Scarpignato C. Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: Clinical picture, pathogenesis, and prevention / C. Scarpignato, R.H. Hunt // *Gastroenterol. Clin. North Am.* – 2010. – V. 39, № 3. – P. 433–464.
298. Schroeder J.J. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures / J.J. Schroeder, R.J. Cousins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87, № 8. – P. 3137–3141.
299. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria / T. Ayabe, D.P. Satchell, C.L. Wilson [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2000. – V. 1, № 2. – P. 113–118.
300. Selective arginines are important for the antibacterial activity and host cell interaction of human α -defensin 5. / E. De Leeuw, M. Rajabi, G Zou [et al.] // *FEBS Lett.* – 2009. – V. 583, №15. – P. 2507–2512 .
301. Selsted, M.E. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells / M.E. Selsted, A. J. Ouellette // *Trends Cell. Biol.* – 1995. – V. 5, № 3. – P. 114–119.
302. Shankar A.H. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection / A.H. Shankar A.S. Prasad // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1998. – V. 68, № 2. – P. 447–463.
303. Shaw D. Intestinal mucosal atrophy and adaptation / D. Shaw, K. Gohil, M.D Basson // *World J. Gastroenterol.* – 2012. – V. 18, № 44. – P. 6357–6375.

304. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans / I. Bjarnason, J. Hayllar, A. J. MacPherson, A.S. Russell // *Gastroenterology*. – 2003. – V. 104, № 6. – P. 1832–1847.
305. Simon S.F. Dietary Zinc Supplementation Attenuates Hyperglycemia in db/db Mice / S.F. Simon, C.G. Taylor // *Exp. Biol. Med.* – 2001. – V. 226, № 1. – P. 43–51.
306. Slater T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury / T.F. Slater // *Biochem J.* – 1984. – V. 222, № 1. – P. 1–15.
307. Small intestinal injury caused by NSAIDs aspirin: finding new from old / T. Arakawa, T. Watanabe, T. Tanigawa [et al.] // *Cur. Med. Chem.* – 2012. – V. 19, № 1. – P. 77–81.
308. Smith W.L. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology // W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. – V. 69. – P. 145–182.
309. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease / A. Swidsinski, J. Weber, V. Loening-Baucke [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – V. 43, № 7. – P. 3380–3389.
310. Spondylocheiro dysplastic form of the Ehlers-Danlos syndrome—an autosomal-recessive entity caused by mutations in the zinc transporter gene SLC39A13 / C. Giunta, N.H. Elcioglu, B. Albrecht [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – V. 82, № 6. – P. 1290–1305.
311. Sudarshan R.C. Modulatory effect of spondias pinnata bark extract on intestinal MPO & sucrase activities in etoposide induced rat model for mucositis // R.C. Sudarshan, V.S. Beena, M.R. Gayathri / *Interl J. Biol. & Pharm. Res.* – 2014 V. 5, № 5. – P. 396–402.
312. Suh S.W. Detection of Pathological Zinc Accumulation In Neurons: Methods for Autopsy, Biopsy, and Cultured Tissue / S.W. Suh, K. Listiack, B. Bell [et al] // *J.Histoch. Cytochem.* – 1999. – V. 47, № 7. – P. 969–972.
313. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin / H.L. Cash, C.V. Whitham, C.L. Behrendt, L.V. Hooper // *Science*. – 2006. – V. 313, № 5790. – P. 1126–1130.

314. Synergistic cytolysis mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins / A.K. Lichtenstein, T. Ganz, M.E. Selsted, R.I. Lehrer // *Cell Immunol.* – 1988. – V. 114, № 1. – P. 104–116.
315. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis / K. Yasukawa, H. Tokuda, X. Tun [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2012. – V. 46, № 12. – P. 1427–1436.
316. The human zinc transporter SLC39A8 (Zip8) is critical in zinc-mediated cytoprotection in lung epithelia / B. Besecker, S. Bao, B. Bohacova [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2008. – V. 294, № 6. – P. 1127–1136.
317. The influence of zinc status and malnutrition on immunological function in Crohn's disease / C. Ainley, J. Cason, B.M. Slavin [et al.] // *Gastroenterology.* – 1991. – V. 100, № 6. – P. 1616–1625.
318. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria / M.E. Johansson, M. Phillipson, J. Petersson [et al.] // *PNAS.* – 2008. – V. 105, № 39. – P. 15064–15069.
319. The multifaceted Paneth cell / E.M. Porter, C.L. Bevins, D. Ghosh, T. Ganz // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2002. – V. 59, №1. – P. 156-170.
320. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways / T. Fukada, N. Civic, T. Furuichi [et al.] // *PLoS One.* – 2008. – V. 3, № 11. – P. 3642–3650.
321. The zinc transporter SLC39A8 is a negative feedback regulator of NFκB through zinc-mediated inhibition of IKK / M.-J. Liu, S. Bao, M. Galvez-Peralta [et al.] // *Cell. Rep.* – 2013. – V. 3, № 2. – P. 386–400.
322. Thomson A. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease / A. Thomson, D. Hemphill, K.N. Jeejeebhoy // *Dig. Dis.* – 1998. – V. 16, № 3. – P. 152–158.
323. Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3p expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis* / R. Dessein, M. Gironella, C. Vignal [et al.] // *Gut.* – 2009. – V. 58, № 6. – P. 771–776.
324. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell

- function / H. Kitamura, H. Morikawa, H. Kamon [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2006. – V. 7, № 9. – P. 971–977.
325. Truong-Tran A.Q. Altered zinc homeostasis and caspase-3 activity in murine allergic airway inflammation / AQ Truong-Tran, RE Ruffin, PS Foster [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2002. – V. 27, № 3. – P. 286–296.
326. Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes / M.J. Bidgood, O.S. Jamal, A.M. Cunningham, P.M. Brooks // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165, № 5. – P. 2790–2797.
327. Use of *Amaranthus hybridus* to reduce toxic effects of some heavy metals in Guinea Pig (*Cavia porcellus*) tissues / P. Tawari-Fufeyin, E.A. Ogie-Odia, O.C. Asemota [et al.] // *Bioscience Research Communications.* – 2008. – V. 20, № 5. – P. 1–9.
328. Uzzo R.G. Diverse effects of zinc on NFκB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression / R.G.Uzzo, P.L.Crispen, K. Golovine [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2006. – V. 27, № 10. – P. 1980–1990.
329. Vane J.R. Cyclooxygenases 1 and 2 / J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M.Botting // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1998. – V. 38 – P. 97–120.
330. Video capsule endoscopy to prospectively assess small bowel injury with celecoxib, naproxen plus omeprazole, and placebo / J.L. Goldstein, G.M. Eisen, B. Lewis [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – V. 3, № 2. – P. 133–141.
331. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg1611 phenotypes in intestine / K. Cadwell, K.K. Patel, N.S. Maloney [et al.] // *Cell.* – 2010. – V. 141, № 7. – P. 1135–1145.
332. Visible small intestinal mucosal injury in chronic NSAID users / D.Y. Graham, A.R. Opekun, F.F. Willingham [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – V. 3, № 1. – P. 55–59.
333. Wallace J.L. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy / J.L. Wallace // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – V. 19, № 12. – P. 1861–1876.


334. Wallace J.L. New pharmacologic therapies in gastrointestinal disease / J.L. Wallace, J.G.P. Ferraz // *Gastroenterol. Clin. North Am.* – 2010. – V. 39, № 3. – P. 709–720.
335. Wallace J.L. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies / J. L. Wallace // *Br. J. Pharmacol.* – 2012. – V. 165, № 1. – P. 67–74.
336. Wellinghausen N. The significance of zinc for leukocyte biology / N. Wellinghausen, L. Rink // *Journal of Leukocyte Biology.* – 1998. – V. 64, № 5. – P. 571–577.
337. Williams R.B. The experimental production of zinc deficiency in the rat / R.B. Williams, C.F. Mills // *Brit. J. Nutr.* – 1970. – V. 24, – №4. – P. 989–1003.
338. Williams S.M. Quantitative analysis of immunolabeling for serotonin and for glutamate transporters after administration of imipramine and citalopram / S.M. Williams, L.J. Bryan-Lluka, D.V. Pow // *Brain Res.* – 2005. – V. 1042, № 2. – P. 224–232.
339. Wolfe M.M. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs / M.M Wolfe., D.R. Lichtenstein, G.N. Singh // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – V. 340, № 24. – P. 1888–1899.
340. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature.* – 2002. – V.415, № 6870. – P. 389–395.
341. Zhang L.Y. Dietary zinc modulation of COX-2 expression and lingual and esophageal carcinogenesis in rats / L.Y. Zhang, Y. Jiang, J.L. Farber / *J. Natl Cancer Inst.* – 2005. – V. 97, № 1. – P. 40-50.
342. Zinc and human health: An update / C.T. Chasapis, A.C. Loutsidou, C.A. Spiliopoulou, M.E. Stefanidou // *Arch.Toxicol.* – 2012. – V. 86, № 4. – P. 521–534.
343. Zinc as a Paracrine Effector in Pancreatic Islet Cell Death / B.J. Kim, Y.H. Kim, S. Kim, [et al.] // *Diabetes.* – 2000. – V. 49, № 3. – P. 367–372.
344. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in caco-2 cells / A. Finamore, M. Massimi, L. C. Devirgiliis [et al.] // *J. Nutr.* – 2008. – V. 138, № 9. – P. 1664–1670.

345. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling / T. Fukada, S. Yamasaki, K. Nishida [et al.] // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2011. – V. 16, № 7. – P. 1123–1134.
346. Zinc supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced fetal growth restriction and demise through its anti-inflammatory effect // Y.H. Chen, M. Zhao, X. Chen // *J. Immunol.* – 2012. – V. 189, № 1. – P. 454–463.
347. Zinc supplementation in oral rehydration solutions: experimental assessment and mechanisms of action / W. Altaf, S. Perveen, K.U. Rehman [et al.] // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2002. – V. 21, № 1. – P. 26–32.
348. Zinc transporter *Znt5/Slc30a5* is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction / K. Nishida, A. Hasegawa, S. Nakae, [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 206, № 6. – P. 1351–1364.
349. Zinc-induced NF-kappaB inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level / C.H. Kim, J.H. Kim, J. Lee, Y.S. Ahn // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2003. – V. 190, № 2. – P. 189–196.
350. Zinc-secreting Paneth cells studied by ZP fluorescence / L.J. Giblin, C.J. Chang, A.F. Bentley [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2006. – V. 54, № 3. – P. 311–316.
351. Zinc, Not Insulin, Regulates the Rat α -Cell Response to Hypoglycemia In Vivo / H. Zhou, T. Zhang, J.S. Harmon [et al.] // *Diabetes.* – 2007. – V. 56, № 4. – P. 1107–1112.

ДОДАТОК 1

ЗАТВЕРДЖУЮ

Протектор з наукової роботи
Запорізького національного

 М. Васильчук
_____ 201__ р.

АКТ

про впровадження результатів дисертаційного дослідження викладача кафедри фізіології з курсом ЦЗ Запорізького національного університету Гороховського Єгора Юрійовича на тему: **“Роль іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії диклофенаку”** на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 — фізіологія людини і тварин.

Комісія у складі:

Голова завідувач кафедри фізіології з курсом ЦЗ, доктор біологічних наук, професор Бовт В.Д.;

Члени комісії: доцент кафедри фізіології з курсом ЦЗ, кандидат біологічних наук, Задорожня В.Ю.;

ст. викладач кафедри фізіології з курсом ЦЗ, кандидат біологічних наук, Кучковський О.М.

цим Актом засвідчує, що результати дисертаційного дослідження Гороховського Є. Ю. на тему: **“Роль іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії диклофенаку”** використані співробітниками кафедри фізіології з курсом ЦЗ Запорізького національного університету при підготовці і викладанні курсу лекцій “Фізіологія людини і тварин” (тема “Фізіологія травної системи”) та проведенні великого практикуму “Фізіологія людини і тварин” (тема “Фізіологія травної системи”).

Голова комісії

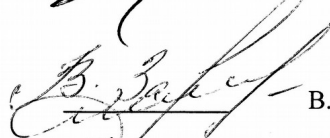
доктор біологічних наук, професор



В.Д. Бовт

Члени комісії

кандидат біологічних наук, доцент



В.Ю. Задорожня

кандидат біологічних наук, ст. викладач



О.М. Кучковський

ДОДАТОК 2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Декан факультету біології, екології та
 медицини Дніпропетровського національного
 університету ім. Олесе Гончара.



проф. О.В. Севериновська

201__р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи Гороховського Єгора Юрійовича “Роль іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії диклофенака” у навчальний процес кафедри фізіології людини і тварин Дніпропетровського національного університету ім. Олесе Гончара.

1. *Назва роботи:* Роль іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії диклофенака.
2. *Автор:* Гороховський Є.Ю., викладач кафедри фізіології з курсом ЦЗ Запорізького національного університету.
3. *Пропозиції до впровадження:* Результати досліджень ролі іонів Zn^{2+} у регуляції функціонального стану слизової оболонки тонкої кишки при її структурно-гемарагічних ушкодженнях, індукованих неселективним інгібітором циклооксигенази.
4. *Актуальність дослідження:* визначається фізіологічні аспекти ролі іонів Zn^{2+} у регуляції функціонального стану слизової оболонки тонкої кишки при її структурно-гемарагічних ушкодженнях.
5. *Установа розробник:* Запорізький національний університет.
6. *Джерела інформації:*
 - Функціональний стан клубової кишки, вміст катіонних білків і цинку в клітинах Панета щурів при введенні лінкоміцину, індометацину та метотрексату / Є.Ю. Гороховський, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2013. –Т. 59, № 3. – С. 78–88.
 - Гороховський Е.Ю. Роль ионов Zn^{2+} в функциональных изменениях слизистой оболочки дистального отдела тонкого кишечника при действии диклофенака : [Электронный ресурс] / Е.Ю. Гороховский // Universum: Химия и биология : электрон. научн. журн. – 2014. – № 10. – Режим доступа : <http://universum.com/en/nature/archive/item/1698>.
 - Вміст секреторного матеріалу та цинку в клітинах Панета при еуноілеїті у щурів // Є.Ю. Гороховський, Ю.В. Єщенко, В.Д. Бовт, В.А. Єщенко // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2011. – Випуск 57. – С. 216–221.
7. *Базова установа, що проводить впровадження:* кафедра фізіології людини і тварин Дніпропетровського національного університету ім. Олесе Гончара.
8. *Форма впровадження:* результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час викладання курсів “Фізіологія людини і тварин” та “Екологія людини”.
9. *Соціально-економічний ефект:* покращення підготовки молодих фахівців з актуальних питань фізіології людини і тварин.

Відповідальний за впровадження

О.Б. Мурзін

д.біол.н., проф., завідувач
 кафедри фізіології
 людини і тварин

ДОДАТОК 3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший протектор
Запорізького державного
медичного університету


 доц. Ю. М. Нерянов
 “ ” _____ 2011 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи Гороховського Єгора Юрійовича «Роль іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії диклофенака» у навчальний процес кафедри гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету

1. *Назва роботи:* Роль іонів Zn^{2+} у функціональних змінах слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за дії диклофенака.
2. *Автор:* викладач кафедри фізіології з курсом ЦЗ Запорізького національного університету.
3. *Пропозиції до впровадження:* Спосіб визначення катіонних білків у клітинах, спосіб гістобактеріоскопічного дослідження кишки.
4. *Актуальність дослідження:* визначається необхідність подальшого вивчення у експериментальних умовах ролі іонів Zn^{2+} у структурно-гемарагічних ушкодженнях слизової оболонки тонкої кишки за дії неселективних інгібіторів циклооксигенази.
5. *Установа розробник:* Запорізький національний університет.
6. *Джерела інформації:*
 - Гороховський Є.Ю., Єщенко Ю.В. Спосіб визначення катіонних білків у клітинах. Пат. України №65514 від 12.12.2011 Бюл. № 23 заявл. 06.05.2011. u2011 05730 МПК G01N 33/50, G01N33/569.
 - Гороховський Є.Ю., Єщенко Ю.В. Спосіб гістобактеріологічного дослідження кишки. Пат. України №61047 від 11.07.2011 Бюл. № 13 заявл. 23.11.2010. u2010 13969 МПКG01N 33/50.
 - Гороховський Є.Ю. Функціональний стан клітин Панета та морфометричні показники кишкового епітелію в щурів при синдромі надлишкового бактеріального росту в тонкій кишці / Є.Ю. Гороховський, Н.В. Григорова, Т.А. Сопрунова // Вісник Запорізького національного університету. Серія біологічна. – 2012. – № 1. – С. 91–99.
7. *Базова установа, що проводить впровадження:* кафедри гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету.
8. *Форма впровадження:* результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час викладання розділу «Травна система».
9. *Соціально-економічний ефект:* покращення підготовки молодих фахівців з актуальних питань гістології

Відповідальний за впровадження



В.К. Сирцов
 д.мед.н., проф., завідувач кафедри
 гістології, цитології та ембріології