

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

БАБЕНКО ОЛЬГА В'ЯЧЕСЛАВІВНА

УДК: 57.084:001.891.54:546.655.31:547.973:616.348 – 002.44 – 002.18

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ І ПРОЛІФЕРАЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ
РОЗВИТКУ ТА КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ У
ЩУРІВ**

за спеціальністю 222 «Медицина», галузь знань 22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

_____ Бабенко О. В.

Науковий керівник – **Наконечна Оксана Анатоліївна** – доктор медичних
наук, професор

м. Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Бабенко О. В. Роль процесів апоптозу і проліферації в механізмах розвитку та корекції експериментального коліту у щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина, галузь знань – 22 Охорона здоров'я. – Харківський національний медичний університет МОЗ України, Харків, 2025.

Дисертація присвячена вивченню біохімічних механізмів розвитку запальних процесів у слизовій оболонці товстої кишки за умов хімічно індукованого хронічного коліту у щурів, а також механізмів регенерації за умов застосування наночастинок діоксиду церію.

Експериментальне дослідження проводилось на 36 щурах популяції WAG, віком 4-5 місяців, масою 220 ± 20 г, отриманих з експериментальної біологічної клініки Харківського національного медичного університету. Методом випадкової вибірки експериментальні тварини були поділені на 6 груп з проведенням двох серій експерименту: до першої контрольної групи увійшли 6 інтактних щурів, які вживали чисту питну воду. До другої групи увійшли 6 щурів з експериментальним колітом, викликаним пероральним введенням розчину декстрансульфату натрію (DSS, ДСН) (молекулярна маса 40 кДа; PanReac AppliChem, Німеччина) у питній воді. Третю групу склали 6 щурів, яким після індукування експериментального коліту за допомогою DSS, на 39-ту добу корегували патологічний стан пероральним введенням наночастинок діоксиду церію (CeO_2), отриманих на базі Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України. Проведене експериментальне дослідження ухвалено комісією з етики та біоетики Харківського національного університету (протокол № 6 від 02.10.2019 року).

У результаті проведеної експериментальної роботи за допомогою клінічного аналізу крові встановлено: лейкоцитоз - підвищення вмісту лейкоцитів на 58,1 % в крові щурів з експериментальним колітом, при цьому відсоток моноцитів підвищувався в 3,16 разів у порівнянні з показниками крові

інтактних тварин. Після корекції патологічного стану наночастинками діоксиду церію вміст лейкоцитів зменшувався в 1,66 разів відносно показників у щурів з експериментальним колітом до корекції та майже не відрізнявся від рівнів лейкоцитів крові тварин контрольної групи. Після проведеної наночастинками корекції відсоток моноцитів знижувався майже у 2 рази, але так й залишався підвищеним у порівнянні з контрольною групою. Вміст лейкоцитів після корекції знижувався в 1,98 разів у порівнянні з показниками до корекції. Вміст тромбоцитів у крові щурів з модельованим хронічним колітом перевищував в 3,67 разів показники в групі інтактних тварин. Цей показник знижувався на 16,2 % після корекції наночастинками діоксиду церію, але не сягав показників, що спостерігалися у крові тварин контрольної групи. Підсумовуючи, на підґрунті дослідження клінічного аналізу крові щурів з експериментальним колітом, нами було встановлено вірогідне підвищення загальної кількості лейкоцитів і відсоток клітин кожної популяції.

Нейтрофіли – популяція фагоцитуючих лейкоцитів, що відіграють важливу роль у захисті від патогенної мікробіоти. Активні форми кисню (АФК) (супероксид, гідроксильний радикал, пероксид водню, синглетний кисень), що продукують нейтрофіли, виконуючи свою бактерицидну дію, також задіяні в механізмах регуляції апоптозу. Встановлено також, що АФК сприяють перекисному окисленню ліпідів (ПОЛ), яке приводить до порушення цілісності клітинної мембрани.

На даний час 8-ізопростан розглядається як маркер раннього перекисного окислення ліпідів і розладу функціонування оксидантно-антиоксидантної системи. У результаті проведеного аналізу вмісту 8-ізопростану в сироватці крові щурів з експериментальним хронічним колітом, спостерігалось підвищення цього показника на 68,6 %, що може вказувати на активацію вільно радикальних процесів у порівнянні з щурами контрольної групи. Після проведення корекції наночастинками діоксиду церію спостерігалось зниження вмісту 8-ізопростану в крові на 24,7 %, але показник залишався підвищеним у порівнянні з тваринами контрольної групи.

Тому, визначення маркера оксидативного стресу в крові, а саме 8-ізопростану, можливо використовувати як для ранньої діагностики запальних захворювань кишечника, так і для оцінки ефективності проведеного лікування. Дослідження активності ензимів антиоксидантної системи у щурів, компоненти якої пом'якшують ефекти дії вільних радикалів, показало значне підвищення в крові активності супероксиддисмутази – на 46,47 % і каталази – на 95,1 % у порівнянні з показниками у щурів контрольної групи. Отримані дані вказують на активацію ензиматичної ланки антиоксидантного захисту. Після корекції патологічного стану діоксидом церію спостерігалось зниження активності досліджуваних ензимів приблизно на 22 %.

За допомогою методу проточної цитофлуориметрії нами були досліджені такі важливі показники, як генерація активних форм кисню в лейкоцитах, гранулоцитах крові щурів, життєздатність лейкоцитів та види їхньої клітинної загибелі в крові щурів контрольної та експериментальної груп. Утворення активних форм кисню обумовлює фагоцитарну активність лейкоцитів. Але у разі перевищення продукції оксидантів, виникає оксидативний стрес, що призводить до пошкодження біомолекул (ДНК, РНК, протеїнів тощо) та клітинних структур, зокрема мембран. Дослідження генерації АФК в лейкоцитах дозволяє виявити розвиток оксидативного стресу на ранній стадії і оцінити вплив наночасток діоксиду церію, застосованих для корекції запальних процесів у кишечнику тварин. Визначена середня інтенсивність флюоресценції (СІФС) дихлорфлюоресцеїну (ДХФС) в лейкоцитах щурів контрольної та експериментальних груп. У життєздатних лейкоцитах (CD-45-позитивних і 7-AAD-негативних) щурів з хімічно модельованим хронічним колітом було виявлено збільшення середньої інтенсивності флюоресценції на 38,5 % у порівнянні з інтактними тваринами, що вказує на статистично достовірно підвищену генерацію АФК в моноцитах та гранулоцитах крові щурів з індукованим хронічним колітом. Після корекції наночастинками діоксиду церію СІФС ДХФС достовірно знижувалася на 33,05 % у порівнянні з показниками до корекції і практично не відрізнялися від референтних значень. Також нами було

досліджено СІФС ДХФС у популяції життєздатних гранулоцитів (нейтрофілів, базофілів і еозінофілів). Отримані дані свідчать про статично значуще підвищення генерації АФК в популяції гранулоцитів щурів експериментальної групи – на 46,0 % у порівнянні з нормальними показниками. Після проведеної корекції цей показник зменшився на 13,2 %, але не повернувся до значень, визначених у інтактних тварин. Таким чином, наночастинки діоксиду церію найбільш впливали на моноцити крові щурів з експериментальним колітом.

Апоптоз - один з видів клітинної загибелі. Проточна цитометрія дозволяє виявити маркери апоптозу, найбільш специфічним з яких є екстерналізація фосфатидилсерину (ФС) в цитоплазматичній мембрані (ЦПМ). За нормальних умов даний фосфоліпід розташований у внутрішньому бішарі ЦПМ. Екстерналізація ФС є маркером раннього апоптозу. Барвник анексін V зв'язується з ФС на поверхні ЦПМ, за рахунок чого інтенсивність флуоресценції вказує на кількість ФС на зовнішньому фосфоліпідному бішарі ЦПМ. Пізній апоптоз характеризується підвищенням проникності клітинної мембрани, через що барвник 7-AAD може проникати всередину клітини і там визначатися. У крові щурів контрольної групи превалювали життєздатні клітини над ранньо-, пізньоапоптотичними і некротичними. В крові щурів двох експериментальних груп спостерігалось зменшення в 1,46 рази у відсотковому відношенні життєздатних клітин ($p=0,022$) на тлі збільшення відсотку апоптотичних (ранньоапоптотичні клітини в 38,6 рази, пізньоапоптотичні – в 5 ($p<0,001$), некротичні – в 3,56 рази ($p<0,01$)) лейкоцитів у крові щурів експериментальної групи в порівнянні з інтактними тваринами. Після корекції наночастинками діоксиду церію відсоток життєздатних лейкоцитів збільшився в 1,25 рази, відсоток ранньоапоптотичних клітин знизився в 1,95 рази, пізньоапоптотичних – в 1,98, некротичних – у 2,28 (відсоток некротичних клітин повернувся до рівня, визначеного в контрольній групі).

У теперішній час вважається, що основними факторами розвитку запальних захворювань кишечника є: генетична схильність, вплив негативних факторів середовища, порушення імунної відповіді з дисбалансом мікробіому

кишечника. Дисбаланс цитокінів (про- та протизапальних) розглядається як чинник пошкодження бар'єрної функції слизової оболонки кишечника.

У ході дослідження було визначено вміст в сироватці дослідних тварин про- та протизапальних цитокінів: IL-1 β , TNF- α та IL-10. Отримані дані свідчать про підвищення в крові щурів з експериментальним колітом прозапальних цитокінів IL-1 β та TNF- α на 142,3 % і на 90,9 % відповідно у порівнянні з показниками інтактних тварин. Після корекції наночастинками діоксиду церію вміст прозапальних інтерлейкінів знижувався на 35,6 % для IL-1 β та на 44,93 % TNF- α у порівнянні з вмістом в крові до корекції, але залишався підвищеним на 56,0 % та 31,5 % відповідно у порівнянні з контролем. Вміст протизапального інтерлейкіну IL-10 в крові щурів з модельованим колітом був підвищений у 2,22 рази у порівнянні з показником у інтактних тварин. Після корекції вміст IL-10 залишався майже на тому самому рівні. Нами були розраховані коефіцієнти значущості впливу прозапальних цитокінів K_1 (IL-1 β /IL-10), що склав: 0,4 в контрольній групі, 0,44 – в експериментальній і 0,26 після корекції, та K_2 (TNF- α /IL-10) – 1,63, 1,406 і 0,9 відповідно, що свідчить про більш значущий вплив TNF- α в розвиток патологічного процесу в кишечнику щурів за умов експериментального коліту. Моноцитарно-хемокіновий протеїн-1 (MCP-1) є одним із головних факторів хемотаксису моноцитів у вогнище запалення. Розвиток експериментального хронічного коліту у щурів супроводжувався статистично достовірним підвищенням вмісту MCP-1 в сироватці крові тварин експериментальної групи – на 27,5 % у порівнянні з вмістом у сироватці інтактних тварин. Після корекції наночастинками діоксиду церію вміст MCP-1 зменшувався на 14,71 % у порівнянні з показниками до корекції, але не досягав показників у тварин контрольної групи. Серпін A4 розглядається як антагоніст MCP-1 і може знижувати фібриноліз і стимулювати ангиогенез. Визначали достовірне збільшення вмісту серпіну A4 в сироватці крові тварин експериментальної групи – в 2,73 рази у порівнянні з контролем. Після корекції наночастинками спостерігалось зниження цих показників в 2,55 рази у

порівнянні з вмістом серпіну А4 до корекції, але значень показників у контрольній групі так і не було досягнуто.

У експериментальних тварин спостерігався розвиток оксидативного стресу, підвищена генерація АФК в лейкоцитах на тлі розвитку запального процесу. Відбувається пошкодження ЦПМ за умов активності перекисного окислення ліпідів, з подальшою зміною фізико-хімічних властивостей мембран (а саме плинності через дегідратацію) і, таким чином, порушенням їх функціонування. Для дослідження фізико-хімічних властивостей мембран лейкоцитів використовували флуоресцентні зонди ОбО (визначається в районі карбонільних груп та жирнокислотних хвостів фосфоліпідів (ФЛ)), РН7 (визначається в області жирнокислотних хвостів ФЛ) та О1О (розташовується в ділянці гліцеринових голівок ФЛ, біля карбонільних груп ФЛ та жирнокислотних ланцюжків ФЛ поряд з карбонільними групами). В зоні локалізації зондів ОбО та РН7 в фосфоліпідному бішарі мембран лейкоцитів не відмічалися зміни фізико-хімічних властивостей мембран. Найбільш значні результати були отримані при використанні зонду О1О – співвідношення інтенсивності флуоресценції у щурів експериментальної групи перевищувало на 41,0 % цей показник в групі інтактних тварин. Після корекції наночастинками діоксиду церію співвідношення інтенсивності флуоресценції знижувалось на 10,2 % у порівнянні з показниками до лікування, але залишалось на 26,7 % вище у порівнянні з контролем. Отримані дані свідчать про більш високу дегідратацію мембран лейкоцитів щурів у зоні карбонільних груп фосфоліпідів та в області вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів поблизу полярної області бішару. Дегідратація вказує на зменшення плинності мембран лейкоцитів через посилення процесів ПОЛ в організмі щурів з експериментальним колітом. Те, що в дослідженні не було виявлено статистично значущих змін флуоресценції у суспензії лейкоцитів щурів, які отримували перорально протягом двох тижнів розчин наночастинок діоксиду церію, свідчить про те, що наночастинки не мають мембранотоксичної дії.

Було проведено морфологічне дослідження препаратів товстої кишки щурів трьох досліджуваних груп. Мікроскопія поверхневого епітелію при забарвленні гематоксилін-еозином виявила зменшення кількості келихоподібних клітин, у власній пластинці відмічалась інфільтрація макрофагами та лейкоцитами, що вказує на пошкодження епітеліального бар'єру. На підставі змін клітинного інфільтрату (зміна щільності, складу та розподілу клітин інфільтрату) оцінювали наявність коліту. Дифузна поліморфноядерна інфільтрація слизової оболонки (СО), наявність вогнищевих ішемічних ділянок в СО товстої кишки, нерівномірні вогнища зі зниженою проліферацією свідчать про розвиток змін в препаратах товстої кишки щурів експериментальної групи, характерних для коліту. Проведене гістохімічне дослідження білка Кі-67 (індикатора проліферації) виявило достовірне збільшення експресії білка Кі-67 більше ніж у 2 рази ($p < 0,05$) в СО товстої кишки тварин з індукованим DSS колітом. Для оцінки складу клітинного інфільтрату власної пластинки слизової проводилось також імуногістохімічне дослідження маркерів Т-лімфоцитів (CD3) та макрофагів (CD68), що показало візуалізацію CD3-позитивних клітин у власній пластинці як у тварин експериментальної групи, так і у інтактних щурів. У разі експериментального коліту абсолютна кількість CD3-позитивних клітин була більшою. Кількість CD68-позитивні клітин була майже у два рази більша в зразках, отриманих від тварин експериментальної групи без корекції. Звертає увагу особливість інфільтрації строми товстої кишки, що може свідчити про залучення мікробного компоненту до патогенезу запалення модельованого коліту через те, що більшість CD3-позитивних та CD68-позитивних клітин скупчується в зонах порушення епітеліального бар'єру.

Ключові слова: запальні захворювання кишечника, експериментальний коліт, інтерлейкіни, декстрансульфат натрію, апоптоз, проліферація, наночастинки діоксиду церію.

SUMMARY

Babenko O. V. The role of apoptosis and proliferation processes in the mechanisms of development and correction of experimental colitis in rats. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 – Medicine, field of knowledge – 22 Health Care. – Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2025.

The dissertation is devoted to the study of biochemical mechanisms of the development of inflammatory processes in the colonic mucosa under conditions of chemically induced chronic colitis in rats, as well as mechanisms of regeneration under conditions of the use of cerium dioxide nanoparticles .

WAG rats, aged 4-5 months, weighing 220 ± 20 g, obtained from the Experimental Biological Clinic of Kharkiv National Medical University. The experimental animals were randomly divided into 6 groups with two series of experiments: the first control group included 6 intact rats that consumed clean drinking water. The second group included 6 rats with experimental colitis caused by oral administration of dextran sulfate sodium solution (DSS) (molecular weight 40 kDa; PanReac AppliChem , Germany) in drinking water. The third group included 6 rats, which, after inducing experimental colitis using DSS, on the 39th day the pathological condition was corrected by oral administration of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2), obtained at the Institute of Scintillation Materials of the NAS of Ukraine. The study was approved by the Ethics and Bioethics Commission of Kharkiv National University (protocol No. 6 dated 02.10.2019).

The results of the experimental work using clinical blood analysis showed an increase in the content of leukocytes by 58.1 % in the blood of rats with experimental colitis, while the percentage of monocytes increased by 3.16 times compared to the indicators of intact animals. After correction of the pathological condition with cerium dioxide nanoparticles, the content of leukocytes decreased by 1.66 times compared to the indicators in rats with experimental colitis before correction and almost did not differ from the levels of leukocytes in the blood of animals of the control group. After

correction with nanoparticles , the percentage of monocytes decreased by almost 2 times, but remained elevated by compared to the control group. The content of leukocytes after correction decreased by 1.98 times compared to the indicators before correction.

The platelet content in the blood of rats with induced chronic colitis was 3.67 times higher than in the intact group. This figure decreased by 16.2 % after correction with cerium dioxide nanoparticles , but did not reach the values observed in the control group.

In summary, based on a study of clinical blood analysis of rats with experimental colitis, we found a significant increase in the total number of leukocytes and the percentage of cells in each population.

Neutrophils are a population of phagocytic leukocytes that play an important role in protecting against pathogenic microbiota. Reactive oxygen species (superoxide , hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen) produced by neutrophils , performing their bactericidal action, are also involved in the mechanisms of apoptosis regulation . It has also been established that ROS contribute to lipid peroxidation, which leads to disruption of the integrity of the cell membrane. Currently, 8-isoprostane is considered a marker of early lipid peroxidation and dysfunction of the oxidant-antioxidant system.

As a result of the analysis of the content of 8-isoprostane in the blood serum of rats with experimental chronic colitis, an increase of this indicator by 68.6 % was observed, which may indicate the activation of free radical processes in comparison with rats of the control group. After correction with cerium dioxide nanoparticles, a decrease in the content of 8-isoprostane in the blood by 24.7 % was observed, but the indicator remained elevated in comparison with animals of the control group.

A study of the activity of enzymes of the antioxidant system in rats, the components of which mitigate the effects of free radicals, showed a significant increase in the activity of superoxidedismutase - by 46.47 % and catalase - by 95.1 % in the blood. The obtained data indicate the activation of the enzymatic link of antioxidant protection. Determination of the marker of oxidative stress in the blood, namely 8-

isoprostane, can be used both for early diagnosis of inflammatory bowel diseases and for assessing the efficiency of the treatment. After correction of the pathological condition with cerium dioxide, a decrease in the activity of the studied enzymes by approximately 22 % was observed.

Using the method of flow cytometry, we investigated such important indicators as the generation of reactive oxygen species in leukocytes and rat granulocytes, leukocyte viability, and types of their cell death.

The formation of reactive oxygen species determines the phagocytic activity of leukocytes. However, if the production of oxidants exceeds the production of antioxidants, oxidative stress occurs, which leads to damage to biomolecules (DNA, RNA, proteins, etc.) and membranes. The study of the generation of reactive oxygen species in leukocytes allows us to detect the development of oxidative stress at an early stage and assess the effect of cerium dioxide nanoparticles used to correct inflammatory processes in the intestine. The average fluorescence intensity (IFS) of dichlorofluorescein (DCFS) in leukocytes of rats of the control and experimental groups was determined. In viable leukocytes (CD-45-positive and 7-AAD -negative) of rats with chemically modeled chronic colitis, an increase in the average fluorescence intensity by 38.5 % was found compared to intact animals, indicating a statistically significant increased generation of reactive oxygen species in monocytes and granulocytes of the blood of rats with induced chronic colitis. After correction with cerium dioxide nanoparticles, the DCFS CIFS significantly decreased by 33.05 % compared to the values before correction and practically did not differ from the reference values. We also investigated the DCFS CIFS in the population of viable granulocytes (neutrophils, basophils and eosinophils). The obtained data indicate a statistically significant increase in the generation of reactive oxygen species in the granulocyte population of rats in the experimental group - by 46.0 %. After the correction, this indicator decreased by 13.2 %, but did not return to the values determined in intact animals. Thus, we noted that cerium dioxide nanoparticles had the greatest effect on blood monocytes of rats with experimental colitis.

Apoptosis is a type of cell death. Flow cytometry allows the detection of markers of apoptosis, the most specific of which is externalization of phosphatidylserine (PS) in the cytoplasmic membrane. Under normal conditions, this phospholipid is located in the inner bilayer of the membrane. Externalization of PS is a marker of early apoptosis. Annexin dye V binds to PS on the surface of the plasma membrane – the fluorescence intensity indicates the amount of PS on the outer phospholipid membrane bilayer of the cytoplasmic membrane. Late apoptosis is characterized by an increase in the permeability of the cell membrane, due to which the dye 7-AAD can penetrate the cell and be determined there, which is a marker of late apoptosis. In the blood of rats of the control group, viable cells prevailed over early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells. In the blood of rats of the two experimental groups, a decrease in the percentage of viable cells by 1.46 times ($p=0.022$) was observed against the background of an increase in the percentage of apoptotic (early apoptotic cells by 38.6 times, late apoptotic cells by 5 ($p<0.001$), necrotic cells by 3.56 times ($p<0.01$)) leukocytes in the blood of rats of the experimental group compared to intact animals. After correction with cerium dioxide nanoparticles, the percentage of viable leukocytes increased by 1.25 times, the percentage of early apoptotic cells decreased by 1.95 times, late apoptotic cells by 1.98, and necrotic cells by 2.28 (the percentage of necrotic cells returned to the level determined in the control group).

Currently, it is believed that the main factors in the development of inflammatory bowel diseases are: genetic predisposition, the influence of negative environmental factors, impaired immune response with an imbalance of the intestinal microbiome. Imbalance of cytokines (pro-inflammatory, anti-inflammatory) is considered as a factor in damage to the barrier function of the intestinal mucosa. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is one of the main factors in the chemotaxis of monocytes to the focus of inflammation. There is evidence in the scientific literature that MCP-1 can model the composition of the microbiota and induce fibrosis. The development of experimental chronic colitis in rats is accompanied by a statistically significant increase in the content of MCP-1 in the blood serum of animals of the experimental group - by 27.8 % compared to the content in the serum of intact animals ($p=0.0022$). After

correction with cerium dioxide nanoparticles, the content of MCP-1 decreased by 14.71 % compared to the values before correction ($p=0.0022$), but did not reach the values of the animals of the control group. We determined the content of serpin A4 (kallistatin) in the blood serum of the animals involved in the experiment. Serpin A4 is considered an antagonist of MCP-1 and can reduce fibrinolysis and stimulate angiogenesis. The obtained data indicate a significant increase in the content of serpin A4 in the blood serum of the animals of the experimental group - 2.73 times compared to the control. After correction with nanoparticles, a decrease in these indicators was observed by 2.55 times compared to the content of serpin A4 before correction, but the values of the indicators of the control group were not achieved. During the study, the content of pro- and anti-inflammatory cytokines in the serum of the experimental animals was determined: IL-1 β , TNF- α and IL-10. The obtained data indicate an increase in the blood of rats with experimental colitis of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α by 142.3 % and 90.9 %, respectively, compared with intact animals. After correction with cerium dioxide nanoparticles, the content of pro-inflammatory cytokines Interleukin levels decreased by 35.6 % IL-1 β and by 44.93 % TNF- α compared to the levels before correction, but remained elevated by 56.0 % and 31.7%, respectively, compared to the control. Anti-inflammatory interleukin levels IL-10 in the blood of rats with induced colitis was increased 2.22 times compared to the index in intact animals. After correction, the IL-10 content remained almost at the same level. We calculated the coefficients of significance of the influence of pro-inflammatory cytokines K_1 (IL-1 β /IL-10), which was 0.4 in the control group, 0.44 in the experimental group and 0.26 after correction, and K_2 (TNF- α /IL-10) – 1.63, 1.406 and 0.9 respectively, which indicates a more significant influence of TNF- α on the development of the pathological process in the intestines of rats under conditions of experimental colitis.

As already noted above, under conditions of oxidative stress and increased generation of reactive oxygen species in leukocytes, which are observed against the background of the development of the inflammatory process, damage to cytoplasmic membranes occurs, which occurs through lipid peroxidation, with subsequent changes

in their physicochemical properties (namely, fluidity due to dehydration) and thus disruption of their functioning.

To study the physicochemical properties of leukocyte membranes, we used fluorescent probes O6O (determined in the region of carbonyl groups and fatty acid tails of phospholipids (PL)), PH7 (determined in the region of fatty acid tails of PL) and O1O (located in the region of glycerol heads of PL, near carbonyl groups of PL and fatty acid chains of PL next to carbonyl groups). We found that there were no statistically significant changes ($p < 0.05$) in the fluorescence spectrum of the O6O probe in leukocytes of rats with experimental colitis and after correction with cerium dioxide, which indicates the absence of changes in the phospholipid layer of leukocytes in the regions of localization of the O6O probe. In the fluorescence spectrum of the PH7 probe, a slight difference was observed between the indicators in the experimental, control groups and the group of rats that received cerium dioxide nanoparticles orally. But this difference was not statistically significant ($p < 0.05$). Thus, in the area of localization of the PH7 probe in the phospholipid layer of leukocytes, no change in physicochemical properties is noted. The most significant results were obtained when using the O1O probe - the fluorescence intensity ratio in the experimental group rats exceeded this indicator by 41.0 % in the group of intact animals. After the correction with cerium dioxide nanoparticles, the fluorescence intensity ratio decreased by 10.2 % compared to the indicators before treatment, but remained 26.7 % higher compared to the control. The obtained data indicate a higher dehydration of rat leukocyte membranes in the zone of phospholipid carbonyl groups and in the region of phospholipid hydrocarbon chains near the polar region of the bilayer. Dehydration indicates a decrease in the fluidity of leukocyte membranes due to increased lipid peroxidation processes in the body of rats with experimental colitis. The fact that no statistically significant changes in fluorescence were found in the study in the suspension of leukocytes of rats that received a solution of cerium dioxide nanoparticles orally for two weeks indicates that the nanoparticles do not have a membrane toxic effect.

Morphological study of colon preparations of rats of three study groups was conducted. Microscopy of the surface epithelium stained with hematoxylin-eosin revealed a decrease in the number of goblet cells, infiltration by macrophages and leukocytes was noted in the lamina propria, which indicates damage to the epithelial barrier. Based on changes in the cellular infiltrate (changes in the density, composition and distribution of infiltrate cells), the presence of colitis was assessed. Diffuse polymorphonuclear infiltration of the mucosa, the presence of focal ischemic areas in the mucosa of the colon, uneven foci with reduced proliferation indicate the development of changes in the colon preparations of rats of the experimental group, characteristic of colitis.

Histochemical study of the Ki-67 protein (an indicator of proliferation), conducted by us as part of an experimental study, revealed a significant increase in Ki-67 protein expression by more than 2 times ($p < 0.05$) in the colonic mucosa of animals with DSS- induced colitis.

To assess the composition of the cellular infiltrate of the mucosal lamina propria, immunohistochemical study of T-lymphocyte (CD3) and macrophage (CD68) markers was also performed, which showed visualization of CD3-positive cells in the lamina propria in both experimental group animals and intact rats. In the case of experimental colitis, the absolute number of CD3-positive cells was higher. The number of cells expressing CD68-positive cells were almost twice as high in samples obtained from animals of the experimental group without correction. The peculiarity of infiltration of the colonic stroma is noteworthy, which may indicate the involvement of a microbial component in the pathogenesis of inflammation in simulated colitis due to the fact that the majority of CD3-positive and CD68-positive cells accumulate in areas of epithelial barrier disruption.

Keywords: inflammatory bowel disease, experimental colitis, interleukins, dextran sulfate sodium, apoptosis, proliferation, cerium dioxide nanoparticles.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Babenko O., Vasylyeva I., Nakonechna O., Popova L., Voitenko S., Pustova N. (2022). The viability of leukocytes and reactive oxygen species generation by them in rats with chronic colitis. *Weadomosci lekarskie*, 75 (9 pt 2), 2270-2274. <https://doi.org/10.36740/Wlek202209216>. (Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).

2. Nakonechna O.A, Vyshnytska I, Vasylyeva I.M, Babenko O.V, Voitenko S.A, Bondarenko A.V, Gargin V. (2022). The significance of ischemia for the proliferative activity of the mucosa in inflammatory bowel diseases. *Georgian medical news*, 7 (328), 133-137. PMID: 36318857. (Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).

3. Babenko O. V., Nakonechna O. A. (2025). Stan oksydantno-antyoxydantnoї systemy v organіzмі shuriv z eksperymentalnym kolіtom. *Aktualni problemy suchasnoї medycyny*, 1 (89), 102-106. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.25.1.102>. (Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).

4. Babenko O. V. (2025). Roly monocytnarho-hemokіnovoho proteїnu-1 v patoģenezі khronіchnoģo kolіtu u shuriv. *Eksperymentalna ta klіnіchna fіzіologіya і bіoķīmīya*. 1/2 (103/104): 59–63. <https://doi.org/10.25040/ecpb2025.01-02.059>. (Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).

5. Nakonechna O. A., Vasylyeva I. M., Babenko O. V. Doslіdģennya vміstu serpīnu A4 v krovі u shuriv z eksperymentalnym kolіtom. *Naukovo-praktychna konferenція z mіģnarodnoju uchastju «Aktualni pytannya eksperymentalnoї ta klіnіchnoї bіoķīmīi»* (01 zhovtnya 2021 r., m. Ĥarkiv, Ukraїna), S. 192-193.

Опубліковані наукові праці апробаційного характеру:

5. Nakonechna O. A., Vasylyeva I. M., Babenko O. V. Doslіdģennya vміstu serpīnu A4 v krovі u shuriv z eksperymentalnym kolіtom. *Naukovo-praktychna konferenція z mіģnarodnoju uchastju «Aktualni pytannya eksperymentalnoї ta klіnіchnoї bіoķīmīi»* (01 zhovtnya 2021 r., m. Ĥarkiv, Ukraїna), S. 192-193.

(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).

6. Брюханова Т. О., Бабенко О. В. Генерація активних форм кисню у популяції лейкоцитів щурів з експериментальним колітом. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 24 – 26 січня 2022 р.), С. 29 – 30. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

7. Бабенко О. В., Васильєва І. М. Вміст лейкоцитів в крові щурів при формуванні неспецифічного виразкового коліту. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 13 -15 лютого 2023 р.), С. 336 – 338. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

8. Бабенко О. В., Васильєва І. М., Наконечна О. А. Особливості генерації активних форм кисню лейкоцитами за умов неспецифічного виразкового коліту. Міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція до Всесвітнього дня анатомії (м. Харків, 17 жовтня 2024 р.), С. 106 – 139. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз і статистичну обробку даних та підготовлено матеріали до друку).*

9. Бабенко О. В., Таран О. С., Васильєва І. М. Визначення активності деяких білків гострої фази при експериментальному неспецифічному виразковому коліті. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 15 -17 січня 2024 р.), С. 161 – 162. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

10. Бабенко О. В., Васильєва І. М. Стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи у щурів з експериментальним хронічним колітом. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 5 - 7 лютого 2025 р.), С. 324–325. *(Здобувачем проведені*

експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).

11. Бабенко О. В. Визначення рівнів цитокінів в крові щурів з експериментальним хронічним колітом. Другі наукові читання пам'яті професора Д. О. Альперна: міжнародна науково-практична конференція (м. Харків, 08 - 09 травня 2025 р.), С. 24–26. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

12. Бабенко О. В. Дослідження фосфоліпідного бішару лейкоцитів в крові щурів з експериментальним хронічним колітом. Здобутки клінічної і експериментальної медицини (м. Тернопіль, 12 – 13 червня 2025 р.), С. 204-206. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

Наукові праці, які додатково відображають результати дисертаційної роботи:

13. Васильєва І. М., Бабенко О. В., Наконечна О. А., Попова Л. Д., Войтенко С. А. (2021). Порівняльний аналіз двох видів контролю при формуванні експериментальної моделі хронічного виразкового коліту. Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 4, 56 – 59. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2021.v.i4.12799>. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

14. Бабенко О. В., Брюханова Т. О., Наконечна О. А., Васильєва І. М., Стеценко С. О. (2022). Порівняльна характеристика експериментальних моделей хронічного коліту, що відтворюється в умовах in vivo. *Medicine today and tomorrow*, 91 (1), 6 – 16. <https://doi.org/10.35339/msz.2022.91.1.bbn>. *(Здобувач брав участь у підготовці матеріалу до друку).*

15. Брюханова Т. О., Наконечна О. А., Бабенко О. В. (2023). Сучасний стан, проблеми та перспективи медикаментозної корекції виразкового коліту (огляд літератури). *Bulletin of problems in biology and medicine*, 3 (170)/ 28 – 32.

<https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-3-170-28-39>. *(Здобувач брав участь у підготовці матеріалу до друку).*

16. Бабенко О. В., Васильєва І. М., Ярмиш Н. В., Наконеча О. А. (2024). Сучасні уявлення про патогенетичні механізми розвитку запальних захворювань кишківника. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 1(99), 20-27. <https://doi.org/10.25040/ecpb2024.01>. *(Здобувач брав участь у підготовці матеріалу до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	23
Розділ 1. СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЕТІОПАТОГЕНЕЗ ХРОНІЧНОГО ЕНТЕРОКОЛІТУ ТА СПОСОБИ ЙОГО ЛІКУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	
1.1. Сучасні уявлення про етіологію, патогенез і перебіг запальних захворювань кишечника.....	32
1.2. Експериментальні моделі запальних захворювань кишечника.....	40
1.3. Морфологічні зміни за умов хронічних запальних захворювань кишечника.....	45
1.4. Сучасні патогенетичні методи корекції змін при хронічних запальних захворюваннях кишечника.....	48
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Характеристика біологічного об'єкту дослідження та дизайн експерименту.....	55
2.2. Характеристика наночастинок діоксиду церію, що застосовувались для корекції патологічного стану, а саме експериментального коліту.....	56
2.3. Забір та обробка біологічного матеріалу, біохімічні показники та методи їх дослідження.....	58
2.4. Статистична обробка отриманих даних.....	71
Розділ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ В КРОВІ ОСНОВНИХ ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ ЛЕЙКОЦИТІВ ТА ФІБРОЗУ	
3.1. Клінічний аналіз крові.....	73
3.2. Стан оксидантно-антиоксидантної системи в організмі щурів контрольної та експериментальних груп.....	77

3.3. Генерація активних форм кисню в лейкоцитах периферичної крові щурів контрольної та експериментальних груп.....	83
3.4. Генерація активних форм кисню в лейкоцитарних гранулоцитах периферичної крові щурів контрольної та експериментальних груп.....	92
3.5. Дослідження життєздатності та видів клітинної смерті лейкоцитів крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом.....	95
3.6. Визначення в крові інтактних та експериментальних тварин з хронічним колітом моноцитарно-хемокінового протеїну-1 та серпіну А4.....	101
3.7. Визначення цитокінів: інтерлейкінів -1β , -10 та $TNF-\alpha$ в крові інтактних тварин та щурів з експериментальним хронічним колітом.....	109
3.8. Вплив перорального вживання декстрансульфату натрію на стан фосфоліпідного бішару лейкоцитів крові експериментальних тварин.....	115
 Розділ 4. МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КИШКІВНИКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТ НАТРІЮ.....	126
 Розділ 5. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	137
 ВИСНОВКИ.....	146
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	151
ДОДАТКИ.....	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АОС – антиоксидантна система
АФК – активні форми кисню
АФН – активні форми нітрогену
ВРП – вільнорадикальні процеси
ДСН – декстрансульфат натрію
ДХФС – діхлорфлюоресцеїн
ЕМП – ендотеліально-мезенхімальний перехід
ЗЗК – запальні захворювання кишечника
ІГХ – імуногістохімічний аналіз
КТ – каталаза
НВК – неспецифічний виразковий коліт
ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти
ПОЛ – перикисне окислення ліпідів
ПРГЕ – простагландин Е
СІФС – середня інтенсивність флюоресценції
СОД – супероксиддисмутаза
ФНП- α – фактор некрозу пухлин- α
ФС – фосфатидилсерин
ХК – хвороба Крона
ЦПМ – цитоплазматична мембрана
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
7-AAD – 7-актиноміцин D
IL-1 β – інтерлейкін 1 β
IL-10 – інтерлейкін 10
MCP-1 – моноцитарно-хемокіновий протеїн 1
TNF- α – фактор некрозу пухлин

ВСТУП

Актуальність теми.

Однією з актуальних проблем сучасної гастроентерології та медичної біохімії є визначення біохімічних маркерів розвитку хронічних запальних процесів кишечника, зокрема неспецифічного виразкового коліту (НВК) та хвороби Крона (ХК) [1]. Актуальність досліджень обумовлює постійне зростання захворюваності серед працездатного населення віком від 20 до 40 років, що призводить до виникнення ускладнень та інвалідизації людей молодого віку, що має соціально-економічні наслідки для країни [2, 3].

Відомо, НВК – це хронічне запальне захворювання слизової оболонки товстої кишки невизначеної етіології з розвитком виразково-некротичних змін у дистальних відділах кишки. Це хронічне запальне захворювання супроводжується різноманітними місцевими ускладненнями та позакишковими проявами. Деякі автори в патогенезі хронічних запальних захворювань кишечника визначають зміни імунологічної реактивності з дисбалансом цитокінової регуляції і запуском аутоімунних механізмів, генетичну схильність до розвитку захворювання, дисбіотичні, нервово-психічні порушення, алергічні реакції [4, 5]. Цитокіни здійснюють регуляцію імунної відповіді та процесів запалення, тому відіграють важливу роль у розвитку хронічних запальних захворювань товстої кишки. Дисбаланс про- та протизапальних цитокінів сприяє прогресуванню патологічного процесу, тому дослідження вмісту цитокінів поглиблює знання механізмів розвитку запалення, а також може використовуватись при оцінці ступеня пошкодження слизової оболонки кишки [6]. Розповсюдженість НВК у світі складає 4-20 випадків на 100 тис. населення [7, 8].

Відомо, що ХК – це результат взаємодії внутрішніх та зовнішніх факторів з розвитком локального запалення в різних відділах шлунково-кишкового тракту (ШКТ). За даними авторів в основі патогенезу ХК полягають імунні механізми зі зміною стану епітеліального шару товстої кишки [9]. За лімфатичною теорією

первинні зміни розвиваються в лімфатичних вузлах брижі, що призводить до набряку підслизового шару з подальшою деструкцією стінки кишки [10]. Лейкоцити крові (моноцити, нейтрофіли) виконують захисну функцію шляхом фагоцитозу, є індикаторами запального процесу в організмі. Фагоцитарна активність лейкоцитів обумовлена утворенням активних форм кисню, надмірна генерація яких призводить до розвитку оксидативного стресу [11, 12]. В свою чергу, надмірна генерація АФК кисню провокує проапоптотичні зміни клітин.

Апоптоз, запрограмована клітинна загибель, відбувається в живих організмах і за нормальних умов (розвиток, старіння), як гомеостатичний механізм підтримання популяції клітин. Запрограмована клітинна загибель виконує захисну функцію як в імунних реакціях, так і у разі пошкодження клітин за умов патологічних станів і дії токсичних агентів. Важливо відмітити, що клітинна загибель може відбуватися також шляхом некрозу, фероптозу, піроптозу, анойкісу, партанатоса, аутофагії тощо. Процеси апоптозу та некрозу можуть відбуватися в тканинах незалежно, послідовно і одночасно. Надмірна активація апоптотичних процесів проявляється у деструктивних змінах тканин. У відповідь на деструкцію структурних компонентів клітин активуються процеси проліферації, що направлені на ліквідацію пошкоджень. Дисрегуляція деструктивних процесів (апоптоз, некроз та інші види клітинної загибелі) і регенеративних (проліферація) призводить до прогресування захворювання, виникнення ускладнень і хронізації запального процесу.

На даний час для моделювання хронічного коліту в лабораторних умовах використовують різноманітні моделі, серед яких найбільшого застосування отримали індуковані моделі (наприклад, з використанням декстрану сульфату натрію (DSS)), коли шляхом хімічного руйнування слизового бар'єру кишки відбувається активація імунологічних механізмів в наслідок контакту з антигенами порожнини кишечника [13, 14]. Патологічні зміни, що спостерігаються під час моделювання DSS-коліту, повторюють практично всі стадії перебігу коліту у людини, що дозволяє робити комплексне дослідження розвитку патологічного стану. Даний метод відрізняється малою інвазивністю

(розчин DSS вводиться перорально), відносною дешевизною і легкістю у відтворенні [15, 16].

На теперішній час у біології та медицині актуальним є впровадження нанорозмірних матеріалів [17, 18, 19]. Діоксид церію через його окисно-відновну здатність привертає увагу вчених з точки зору використання цієї особливості для корекції порушень окислювальних процесів в організмі, що також спостерігаються при розвитку запальних захворювань кишечника [20, 21, 22, 23].

Відсутність чітких уявлень про етіопатогенез хронічного коліту призводить до труднощів в діагностиці та лікуванні цих захворювань. Саме тому питання ролі процесів клітинної загибелі та проліферації в біохімічних механізмах розвитку запалення товстої кишки, а також потенціальні шляхи його корекції, зокрема із застосуванням нанотехнологій, залишається актуальним та відповідає потребам сучасної медичної біохімії.

Зв'язок роботи з актуальними програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в межах науково-дослідної роботи кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету за темою: «Біохімічні механізми індукції запалення та засоби його корекції», номер держреєстрації 01200102645. Здобувач був виконавцем зазначеної теми. Тема дисертаційної роботи була затверджена на засіданні Вченої ради Харківського національного медичного університету (протокол № 9 від 17 жовтня 2019 року).

Мета дослідження: визначити роль апоптозу лейкоцитів крові та процесів проліферації в слизовій оболонці товстої кишки в біохімічних механізмах розвитку експериментального хронічного коліту та вивчити ефективність застосування наночастинок діоксиду церію.

Завдання дослідження:

1. Дослідити стан окисидантно-антиоксидантної системи за вмістом в крові основного раннього маркера ліпідної пероксидації – 8-ізопростану та активністю супероксиддисмутази й каталази як компонентів ензиматичної ланки антиоксидантного захисту у тварин контрольної групи та щурів з хімічно індуктованим колітом до та після корекції.

2. Вивчити за допомогою проточної цитометрії інтенсивність генерації активних форм кисню в загальній популяції лейкоцитів, гранулоцитах, визначити життєздатність та види клітинної загибелі лейкоцитів крові, зокрема процесів апоптозу і некрозу в інтактних тварин та щурів з експериментальним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію.
3. Визначити вміст в крові цитокінів: прозапальних TNF- α , IL-1 β та протизапального IL-10 інтерлейкінів як біохімічних маркерів розвитку та хронізації запального процесу в організмі щурів з DSS-індукованим хронічним колітом до та після застосування наночастинок діоксиду церію.
4. Дослідити стан фосфоліпідного бішару мембран лейкоцитів крові експериментальних тварин з використанням флуоресцентних зондів, що є похідними оксазолону.
5. Провести морфологічне дослідження фрагментів товстої кишки, імуногістохімічний аналіз маркеру проліферації Ki-67 та виконати морфометричне дослідження макрофагів CD3 та CD68 в мікропрепаратах товстої кишки у щурів з експериментальним хронічним колітом до та після корекції й у інтактних тварин.
6. Обґрунтувати з використанням інформативних біохімічних та морфологічних показників роль апоптозу лейкоцитів і процесів проліферації в товстій кишці в біохімічних механізмах розвитку експериментального хронічного коліту. Визначити ефективність застосування наночастинок діоксиду церію для корекції патологічного стану.

Об'єкт дослідження: види клітинної загибелі лейкоцитів, зокрема апоптоз та некроз, процеси проліферації за умов експериментального хімічно індукованого виразкового коліту у щурів та корекція патологічного стану наночастинками діоксиду церію.

Предмет дослідження: генерація активних форм кисню лейкоцитами, життєздатність і види клітинної загибелі лейкоцитів, фізико-хімічний стан

мембран лейкоцитів, екстерналізація фосфатидилсерину назовні фосфоліпідного бішару лейкоцитів крові, процеси фіброзу в товстій кишці (серпін A4, MCP-1), стан оксидантно-антиоксидантної системи (8-ізопростан, каталаза, супероксиддисмутаза), прозапальні TNF- α , IL-1 β та протизапальний IL-10 цитокіни, морфологічні особливості товстої кишки, маркер проліферації - білок Ki-67, маркери імунних клітин CD3 та CD68 в тканинах товстої кишки.

Методи дослідження: клініко-лабораторні методи, методи проточної цитофлуорометрії, спектрофотометричний, імуноферментний, морфологічні (гістологічний, імуногістохімічний та морфометричний), математико-статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше на щурах популяції WAG за умов змодельованого експериментального хронічного коліту з використанням DSS було проведено комплексне біохімічне та морфологічне дослідження для з'ясування ролі процесів апоптозу та проліферації в механізмах розвитку патологічного стану.

На підставі отриманих даних клінічного аналізу крові, біохімічних маркерів стану оксидантно-антиоксидантної системи, перекисного окислення ліпідів, дослідження генерації активних форм кисню, життєздатності і видів клітинної загибелі лейкоцитів, дослідження вмісту моноцитарно-хемокінового протеїну-1 й серпіну A4, про- та протизапальних інтерлейкінів, стану фосфоліпідного бішару лейкоцитів, а також морфологічних досліджень тканин товстої кишки, було визначено біохімічні механізми розвитку запальних процесів в кишечнику та обґрунтовано застосування наночастинок діоксиду церію для корекції патологічного стану.

Було доведено розвиток оксидативного стресу за визначенням раннього індикатору інтенсивності ліпідної пероксидації, а саме 8-ізопростану в крові щурів з експериментальним колітом, на тлі оцінки стану антиоксидантної системи за активністю супероксиддисмутази і каталази в різних групах щурів популяції WAG – у інтактних тварин та у тварин з модельованим

експериментальним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію.

Вперше на щурах з індукованим експериментальним колітом було досліджено генерацію активних форм кисню лейкоцитами, життєздатність лейкоцитів та види клітинної загибелі до та після корекції наночастинками. Визначено підвищення генерації АФК в лейкоцитах (моноцитах і гранулоцитах) крові щурів з індукованим колітом, а також збільшення відсотку апоптотичних клітин у крові тварин експериментальної групи.

Встановлено зміни в клінічному аналізі крові у щурів з індукованим хронічним колітом до та після корекції наночастинками: лейкоцитоз, лімоцитоз, моноцитоз.

Вперше було виявлено дисбаланс вмісту прозапальних інтерлейкінів IL-1 β , TNF- α та протизапального інтерлейкіну IL-10 в крові щурів з експериментальним колітом до та після корекції наночастинками, що дозволило дослідити характер протікання запальних процесів, а саме зсув рівноваги у бік домінування прозапальних цитокінів .

За морфологічних досліджень встановили зміни слизової оболонки товстої кишки щурів з індукованим хронічним колітом: інфільтрація власної пластинки товстої кишки макрофагами та Т-лімфоцитами, що вказує на розвиток коліту. Проведено імуногістохімічні дослідження маркерів імунних клітин (CD3 та CD68), що локалізувались в зоні пошкодження епітеліального бар'єру, свідчило про залучення мікробного компоненту до розвитку патологічного процесу та характеру експресії білка Ki-67 й виявили збільшення проліферативної активності у дослідній групі.

Вперше було проведено морфологічне дослідження препаратів товстої кишки у щурів популяції WAG з хронічним колітом після проведення корекції наночастинками діоксиду церію. Вперше із застосуванням флуоресцентних зондів було визначено зміни фізико-хімічних властивостей фосфоліпідного бішару лейкоцитів щурів з експериментальним колітом до та після корекції.

Вперше на щурах популяції WAG з хімічно-індукованим експериментальним колітом було застосовано використання наночастинок діоксиду церію з метою корекції змодельованого патологічного стану.

Практичне значення отриманих результатів

Дисертаційна робота є фундаментальною в галузі медичної біохімії. Дослідження, що було проведене, поглиблює сучасні уявлення про біохімічні та патофізіологічні механізми розвитку хронічного запалення кишечника, індукованого пероральним введенням декстрансульфату натрію, а саме ролі розвитку оксидативного стресу, порушення стану оксидантно-антиоксидантної системи, дисбалансу про- та протизапальних цитокінів, змін вмісту моноцитарно-хемокінового протеїну-1 та серпіну A4, життєздатності лейкоцитів крові, видів клітинної загибелі та зміна інтенсивності генерації активних форм кисню лейкоцитами, зміна фізико-хімічних властивостей фосфоліпідного бішару лейкоцитів, а також вплив на проліферативні процеси під дією перорального прийому наночастинок діоксиду церію. Обґрунтовано доцільність визначення в крові 8-ізопростану як маркеру ліпідної пероксидації, показників апоптозу, некрозу, індикаторів проліферації з метою прогнозування перебігу патологічного стану.

Отримані результати впроваджено у навчальний процес та й науково-дослідну роботу кафедри біологічної хімії ХНМУ (м. Харків, Україна), кафедри клінічної лабораторної діагностики, мікробіології та біологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків, Україна), кафедри загальної та патологічної фізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету (м. Харків, Україна) та кафедри біологічної хімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (м. Харків, Україна), кафедри морфології та громадського здоров'я Навчально-наукового медичного інституту ЧНУ імені Петра Могили.

Особистий внесок здобувача

Дисертація є самостійною науково-дослідною роботою. За участю наукового керівника автором було сформульовано актуальність теми наукового

дослідження та тему дисертаційної роботи, визначено мету та завдання, предмет та об'єкт дослідження, розроблено дизайн експерименту, визначено перелік методик для реалізації поставлених задач, проведено патентно-інформаційний пошук. Здобувачем було особисто проведено моделювання та індукції розвитку хронічного коліту у експериментальних тварин, спостереження за ними і проведення корекції патологічного стану наночастинкаим діоксиду церія, визначення активності та вмісту в крові щурів клініко-лабораторних та біохімічних показників спектрофотометричним й імуноферментним методами.

За консультативною допомогою к. мед. н., доцента Ткаченка Антона Сергійовича (Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини, ХНМУ) проводилось визначення життєздатності лейкоцитів крові щурів, типів клітинної загибелі, а також генерацію активних форм кисню лейкоцитами крові щурів експериментальних груп. За допомогою д. хім. н. Посохова Євгена Олександровича було досліджено стан фосфоліпідного бішару лейкоцитів крові щурів спектрофотометричним методом із застосуванням флуоресцентних зондів.

Морфологічні дослідження були проведені на кафедрі патологічної анатомії за допомогою д. мед. н., професора Гаргіна Віталія Віталійовича. Імуногістохімічні дослідження були проведені на базі центру патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету за допомогою проф. Романюка Анатолія Миколайовича.

Дисертантом було сформульовано основні положення та висновки роботи, особисто написано всі розділи дисертаційної роботи. Ідеї та концепції, що належать співавторам опублікованих наукових праць, у дисертації не використовувались. У дисертаційній роботі немає запозичень результатів інших авторів.

Апробація результатів роботи

Матеріали дисертації повідомлені та обговорені на: Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та

клінічної біохімії» (м. Харків, Україна, 1 жовтня 2021 р.), Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 24-26 січня 2022 р.), Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 13-15 лютого 2023 р.), Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 15-17 січня 2024 р.), Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції до Всесвітнього дня анатомії (м. Харків, Україна, 17 жовтня 2024 р.), Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 5-7 лютого 2025 р.), Других наукових читаннях пам'яті професора Д. О. Альперна: міжнародній науково-практичній конференції (м. Харків, Україна, 8-9 травня 2025р.), Підсумковій LXVIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, Україна, 12-13 червня 2025 р.).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт (з них 2 статті у зарубіжних наукових журналах бази SCOPUS, 6 наукових статей у фахових наукових журналах України, рекомендованих МОН України, категорії В). Результати роботи також представлені в 8 тезах в збірниках наукових конференцій України та інших країн.

Структура та обсяг роботи

Матеріали дисертаційної роботи представлені на 185 сторінках машинного тексту та складаються з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження та 2 розділів власних досліджень, обговорення та узагальнення отриманих результатів, практичних рекомендацій, переліку використаних літературних джерел, що включає 215 джерел (з них 205 - латиницею, 10 - кирилицею), що займають 26 сторінок та додатків на 9 сторінок. Дисертація включає 10 таблиць і 30 рисунків.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЕТІОПАТОГЕНЕЗ ХРОНІЧНОГО ЕНТЕРОКОЛІТУ ТА СПОСОБИ ЙОГО ЛІКУВАННЯ

Відповідно до сучасних уявлень, запальні захворювання органів шлунково-кишкового тракту (ШКТ), такі як ентероколіти, гострі та хронічні коліти є одними з найбільш актуальних проблем сучасної гастроентерології [24].

Треба відмітити високу медико-соціальну значущість даної групи патологій через постійне зростання захворюваності, втрату працездатності, особливо серед людей молодого та середнього віку та доволі високі показники інвалідизації пацієнтів [25]. Крім того, запальні захворювання цієї групи суттєво знижують якість життя, потребують корекції способу життя та раціону харчування, а також тривалої фармакотерапії.

Актуальність зазначеної медичної проблеми визначається також високою частотою хронізації процесу, формуванням супутніх порушень не лише з боку травної системи, але і з боку інших органів та систем.

1.1. Сучасні уявлення про етіологію, патогенез і перебіг запальних захворювань кишечника

Згідно з даними сучасної наукової літератури, хронічні ентероколіти різної етіології провокують суттєві патологічні зміни якісного та кількісного складу мікробіоти тонкого кишечника, що, у свою чергу, призводить до порушень синтезу ряду біологічно активних сполук, зокрема вітамінів групи В, наслідком чого є зміни практично всіх метаболічних процесів, де дані вітаміни виступають у ролі коферментів [26]. Слід також зазначити, що за умов хронічних ентероколітів практично завжди мають місце порушення травлення та абсорбції поживних речовин, що також чинить негативний вплив на загальний стан організму [27].

Нажаль, у значної частини хворих на хронічний ентероколіт розвиваються такі серйозні ускладнення, як утворення фістул, а приблизно у 10% пацієнтів розвивається колоректальний рак, що має несприятливий прогноз для якості та тривалості життя [28]. В останні роки у всьому світі відмічається неухильна тенденція до зростання цього показника - одного із вагомих причин передчасної смертності у пацієнтів молодого та середнього віку.

Відповідно до Міжнародної класифікації хвороб (МКХ-11), серед неінфекційних запальних захворювань кишківника виділяють:

- хворобу Крона (регіонарний ентерит) – тонкої, товстої кишки, неуточнену та інші різновиди хвороби Крона;
- виразковий коліт, зокрема хронічний ентероколіт, ілеоколіт, проктит, ректосигмоїдит, псевдополіпоз ободової кишки, мукозний проктоліт, неуточнений та інші виразкові коліти;
- інші неінфекційні гастроентерити і коліти (радіаційний, токсичний, алергічний та аліментарний інші уточнені та неуточнені неінфекційні гастроентерити та коліти).

Хвороба Крона (ХК) розглядається як хронічне рецидивуюче системне запальне захворювання, що може розповсюдитися на будь-яку частину гастроінтестинального тракту (від ротової порожнини до прямої кишки) і супроводжується позаінтестинальними проявами та асоційованими імунними порушеннями [29]. Позакишкові ускладнення можна поділити на три групи: пов'язані з маніфестацією захворювання (артрити, вузлова еритема, гангренозна піодермія, афтозний стоматит, увеїт, ірідоцикліт, епісклерит), не пов'язані з активністю перебігу захворювання (ревматоїдний артрит, анкілозуючий спонділіт, сакроілеїт, первинний склерозуючий холангіт, остеопороз, остеомаліяція) і прояви, обумовлені довготривалим запаленням та метаболічними порушеннями (холелітіаз, стеатогепатит, тромбоз периферичних вен, тромбоемболія легеневої артерії, амілоїдоз) [30].

Згідно з сучасними уявленнями, хвороба Крона виникає як результат взаємодії ряду факторів. Найчастіше в основі патогенезу хвороби Крона лежать

імунні механізми, що відповідають за стан епітеліального бар'єру кишківника, зокрема, за лімфатичною теорією, первинні зміни розвиваються в лімфатичних вузлах брижейки та лімфоїдних фолікулах кишкової стінки, що призводить до лімфатичного набряку підслизового шару, наслідком чого є деструкція та гранулематоз кишкової стінки [31]. Це системне запальне захворювання характеризується трансмуральним, гранулематозним запаленням.

Неспецифічний виразковий коліт (НВК) – ідіопатичне хронічне запальне захворювання слизової оболонки товстої кишки, найбільш поширене у розвинених регіонах світу [32]. Неспецифічний виразковий коліт супроводжується деструкцією слизової оболонки товстої кишки невивченої етіології з розвитком виразково-некротичних змін. Патологічний процес розвивається переважно у прямій кишці з подальшим поширенням патологічного процесу у проксимальному напрямку [33]. Перебіг НВК супроводжується такими ускладненнями: кишковими перфораціями, стриктурами, профузними кровотечами, підвищується ризик колоректального раку. У зв'язку з тим, що етіопатогенез НВК не відомий, несприятливий прогноз одужання та значний ризик рецидивів, вивчення механізмів патогенезу та обґрунтування терапії хронічних колітів є дуже актуальною проблемою сучасної медичної науки. Клінічна симптоматика НВК залежить від локалізації та перебігу процесу. При загостренні захворювання виникають лихоманка, втрата маси тіла, слабкість, у загальному аналізі крові - лейкоцитоз та анемія [34]. У хворих на НВК спостерігаються також позакишкові прояви – остеопороз, виразки ротової порожнини, артрит, склерозуючий холангіт, гангренозна піодермія, тромбоз глибоких вен, тромбоемболія легеневої артерії [35]. При тривалому перебігу НВК розвивається колоректальний рак [36].

На теперішній час існує декілька класифікацій ВК [37]:

- А) За клінічним перебігом: гостра форма, фульмінантна форма, хронічна форма, рецидивуюча форма, безперервна.
- Б) За локалізацією: дистальний коліт, лівосторонній коліт, тотальний коліт.
- В) За важкістю клінічних проявів: легка, середньотяжка та важка форми.

На теперішній час немає єдиної думки серед науковців щодо етіопатогенезу НВК. Не підтверджено, що виникнення НВК може бути спровоковано будь-яким екзогенним агентом (інфекційним, харчовим). Вірогідно, що механізми розвитку НВК пов'язані з багатьма факторами: віком, статтю, генетичними факторами, якісними та кількісними змінами мікробіоти кишечника, дефектами епітеліального бар'єру кишечника, особливостями харчування тощо [38]. Таким чином, НВК розглядають як багатофакторну патологію, що виникає внаслідок дії різноманітних факторів. Одним з факторів є різні генетичні особливості. Приблизно 47 генних локусів, асоційованих з НВК, відомо на сьогодні. Зв'язок НВК з мутаціями у генах лейкоцитарних антигенів людини HLA та молекулами сигнальних шляхів IL-10 та IL-23, що вказує на порушення функціонування імунної системи, а саме розвиток неспецифічного імунного запалення слизової оболонки кишечника. Визначена роль дефектів епітеліального бар'єру з розвитком НВК (мутації генів EMC1, HNF4 α , ламініна β 1, кадгерина 1). Висока частота захворюваності НВК у родичів, хворих НВК, підтверджує вплив генотипа на розвиток хвороби. При цьому невелика конкордантність по НВК у монозиготних близнюків (6-14 %) вказує на те, що фактори середовища мають вплив на розвиток патологічного стану [39].

Одним з провокуючих факторів, що сприяють розвитку НВК, є фактори навколишнього середовища: огріхи харчування – споживання неякісних продуктів, багатих на вуглеводи і бідних на клітковину, харчових алергенів, нерегулярність харчування (88,2 % хворих); лікарські засоби – антибіотики, нестероїдні протизапальні препарати, оральні контрацептиви (32,5 % хворих); психоемоційний стрес (19,6 % хворих), куріння, УФ опромінення [40].

Також відмічається важлива роль кишкової мікробіоти як одного з тригерів порушення імунної відповіді. Коменсальні бактерії кишечника, що беруть участь у засвоєнні поживних речовин, конкурують за ту саму екологічну нішу з патогенними бактеріями. Патологічна імунна відповідь на нормальну мікрофлору запускає запальний процес у кишечнику через набуття коменсальною мікрофлорою ролі аутоантигенів [41]. Серед патогенних

коменсалів у ролі етіологічних факторів розвитку ХК та НВК розглядають ентеропатогенні *E.Coli*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Pseudomonas fluorescens*. Вважається, що збільшення кількості патогенних бактерій, що прикріплюються до слизової оболонки кишечника, змінюють проникність ентероцитів та посилюють експресію запальних генів та викликають запальні реакції [42]. Деякими авторами відмічається покращення симптомів у пацієнтів при лікуванні антибіотиками, що також вказує на патогенетичну роль мікробіоти у розвитку ХК та НВК [43]. Мета-геномне секвенування мікробної РНК показало зниження різноманітності бактеріального складу у пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника у порівнянні з загальною популяцією [44]. Також помічені особливості складу патогенної мікробіоти в залежності від типу захворювання (ХК чи НВК), тому аутоантитіла до кишкової мікробіоти використовуються для диференціальної діагностики між цими захворюваннями. Встановлено, що антитіла до перинуклеарних нейтрофільних антигенів (pANCA) більше корелюють з НВК, антитіла до мананового полісахариду клітинної стінки *Saccharomyces cervisiale* (ASCA) – з ХК. Також відкриті більш чутливі і специфічні ніж ASCA класи аутоантитіл до гліканів бактерій – ACCA (anti-chitobioside carbohydrate antibodies), AMCA (anti-mannobioside carbohydrate antibodies) та ALKA (anti-laminaribioside carbohydrate antibodies). Також ці антитіла виявляють у 40 % хворих з негативними pANCA та ASCA [45].

Однією з гіпотез патогенезу ЗЗК є зміна в імунній системі організму, а саме цитокіновій регуляції. Провідна роль належить дисбалансу про- та протизапальних цитокінів, що призводить до активації Т- і В-лімфоцитів, макрофагів та запуску аутоімунних механізмів [46].

Вроджена імунна відповідь на мікробні агенти здійснюється через Toll-подібні рецептори (TLR) з подальшою активацією ядерного фактору каппа-В (NFκB). Після чого NFκB активує синтез як прозапальних цитокінів і сполук адгезії (IL-1β, TNF, IL-6, IL-8, ICAM 1 тощо), так і сполук, що мають протизапальні функції (циклооксигеназа 2, TNF-індукований білок, CARD 15, В-дефензини та інші) .

Макрофаги та дендритні клітини синтезують IL-23, що відіграє ключову роль у ранній відповіді на мікроорганізми. IL-23 - цитокін перехресної взаємодії між вродженим та набутиим (адаптивним) імунітетом. IL-23 з IL-6 та IL-21 та трансформуючим фактором росту- β (TGF- β) індукує диференціювання наївних Т-хелперів у клітини Th-17 (Т-хелпери, що через активацію нейтрофілів підтримують бар'єрну функцію слизової оболонки). Лімфоїдні клітини вродженого імунітету групи 3 (ILC3), що безпосередньо взаємодіють з бактеріальною мікробіотою, також стимулюються IL-23. Крім того IL-23 активує інваріантні Т-кілери (NKT-клітини), що також синтезують цитокіни, що продукуються клітинами Th-17 (IL-17, IL-21, IL-22, IL-26) [47].

Під впливом IL-12 відбувається диференціація клітин в бік Th1, що продукують гама-інтерферон (IFN- γ), а також стимуляція вроджених лімфоїдних клітин групи 1 (ILC1), що також продукують IFN- γ . Клітини Th0 диференціюються в клітини Th1, Th2 або Th17 в залежності від наявних патогенів. Але Т-клітини з порушеною регуляцією викликають надмірний розвиток субпопуляцій Т-клітин з подальшою підвищеною продукцією хемокінів та цитокінів. Як результат має місце підвищена секреція клітинами Th1 IFN- γ , а також пов'язаних з клітинами Th17 цитокінів, що саме і спостерігається в кишківнику при ЗЗК [48].

Деякі автори визначають, що крім дисбалансу прозапальних та протизапальних цитокінів слизової оболонки кишківника у хворих на НВК спостерігається дисглобулінемія – порушення у співвідношенні імуноглобулінів крові. Це виражається у зниженні вмісту в крові IgA та IgM на тлі збільшенні рівня IgG. При цьому ступінь виразності цих змін корелює зі ступенем важкості перебігу ЗЗК [49].

Слід відмітити ще одну гіпотезу патогенезу ЗЗК, де ключова роль у розвитку патологічного процесу відведено ендотелію судин, а саме гіпотезу виникнення ендотеліальної дисфункції, за умов якої ендотелій починає продукувати прозапальні цитокіни, молекули адгезії та фактори росту в підвищених концентраціях. Тривалий перебіг ХК та НВК призводить до

дисбалансу системи згортання крові зі схильністю до гіперкоагуляції, що опосередковано зміною продукції оксиду азоту ендотеліальними клітинами, активацією системи згортання крові зі збільшенням концентрації фібриногену плазми крові, зниженням антикоагулянтної дії антитромбіну-3, білка-S [50].

Але найважливіша роль у всіх розглянутих гіпотезах належить генетичної схильності до розвитку ХК та НВК, що було розглянуто в багатьох дослідженнях [51]. Відмічається, що 20% хворих на ЗЗК мають родичів першої лінії із зазначеною патологією. Було встановлено, що у осіб з обтяженим спадковим анамнезом частота виникнення НВК вища у 4, а ХК – у 2 рази [52]. За допомогою генетичних досліджень встановлено більше ніж 100 генів, що відповідають за розвиток ЗЗК (виявлено модифікації генів-регуляторів цілісності слизового бар'єру, вродженої імунної відповіді та мікробного гомеостазу). Наприклад, ген CARD15 (раніше - NOD2) розташований на довгому плечі 16 хромосоми (16q12), кодує білок, що містить домен активації каспази 1, таким чином, бере участь у регуляції апоптозу. В результаті взаємодії білка гену CARD15 з мурамідипептидом стінки бактеріальної клітини відбувається активація NF κ B, що індукує синтез мітоген-активованої протеїнкінази, що стимулює продукцію прозапальних цитокінів, серед яких фактор некрозу пухлин α (TNF- α) та IL-16 [53]. У теперішній час виділяють три поліморфні варіанти гену CARD15 – Arg702Trp, Gly908Arg, c.3020C, пов'язаних з підвищеним ризиком розвитку захворювання ЗЗК. У результаті проведеного повногеномного дослідження асоціацій було отримано дані, що поліморфізм гену NKX2-3, що бере участь у регулюванні ендотеліну-1, також асоціюється зі схильністю до розвитку ЗЗК [54]. Стандартні методи діагностики НВК (фіброгастроскопія, колоноскопія, ірригоскопія) є високоінвазивними, тому перспективним є пошук неінвазивних методів діагностики. І саме те, що молекулярні механізми патогенезу ЗЗК не до кінця вивчені, ускладнюється пошук інформативних біохімічних маркерів, які б дозволяли вчасно виявляти схильність до розвитку цієї патології, діагностувати ранні стадії захворювання та перебіг ЗЗК [55]. Саме порушення вродженої

відповіді слизової оболонки кишечника, особлива чутливість до мікробіоти, специфічна білкова відповідь можуть приймати участь у розвитку НВК.

На сучасному етапі одним з найперспективніших методів у діагностиці ЗЗК є визначення специфічних мікроРНК(miRNA) у сироватці крові [56]. МікроРНК - невеликі (18-25 нуклеотидів) некодуючі молекули РНК, що виконують посттранскрипційну регуляцію експресії генів опосередковано через РНК-зв'язуючі білки і ендорибонуклеази. Профіль мікроРНК сироватки крові корелює з профілем мікроРНК у клітинах, тобто цей профіль можна використовувати як біомаркер при НВК. Для визначення профілів мікроРНК використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу. Було ідентифіковано 8 мікроРНК (miRs-28-5p, -102-2, -149, -151-5p, -340, -505, -532-3p, miR-plus-E1153), що пропонують використовувати для диференціальної діагностики НВК та ХК. Крім того визначення певних мікроРНК може допомогти в оцінці ефективності лікування [57]. У клітинах товстої кишки було виявлено наступні мікроРНК: miR-7, miR-24, miR-146a, miR-181b, miR-214, miR-372 та miR-373 за допомогою методу з використання інгібіторів мікроРНК у скринінгу нових регуляторів NF-κB. Рівні мікроРНК можуть змінюватися за умов застосування різних методів терапії та тривалості захворювання.

З даних сучасної наукової літератури відомо, що перебіг хронічного виразкового коліту супроводжується формуванням важких ускладнень. Спеціалісти відмічають інші несприятливі тенденції: зростання частоти випадків патологічного процесу в ранньому віці, більш серйозні позакишкові прояви, резистентність або ефективність стандартної терапії, розвиток резистентності до лікарських препаратів за умов використання традиційної терапії, рання інвалідизація пацієнтів, що потребує подальшого дослідження біохімічних механізмів, що лежать в основі патогенезу патології з метою удосконалення та розробки нових терапевтичних підходів [58]. Очевидно, що розробка нових напрямів корекції можлива за умов предметного вивчення патогенетичних механізмів патологічного процесу та потребує відтворення модельної патології

на лабораторних тваринах, причому, принципово важливим є її відповідність тим патологічним змінам (морфологічним, клінічним, лабораторно-біохімічним тощо), що мають місце в організмі людини. Для вирішення цієї проблеми у рамках доклінічного вивчення патогенетичних механізмів хвороби використовуються різні експериментальні моделі виразкового коліту, які мають певні особливості щодо відтворення.

1.2. Експериментальні моделі запальних захворювань кишківника

У теперішній час за даними різних авторів, експериментальні моделі запальних захворювань кишківника у тварин умовно можна поділити на чотири категорії: спонтанні моделі, індуковані моделі у мишей з нормальною імунною системою, моделі адаптивного переносу у тварин зі компрометованою імунною системою та методи з використанням ліній генно-модифікованих тварин (трансгенні миші, нокаутні миші тощо) [59].

Існуючі моделі спонтанного коліту. Вважається, що однією із провідних причин розвитку запальних захворювань кишківника у людини є генетична схильність, яка на тлі провокуючих факторів є чинником високого ризику розвитку та маніфестації захворювання. Експериментальні моделі спонтанного коліту мають певні переваги, порівняно із індукованими моделями у разі виявлення генетичної схильності до запалення слизової оболонки кишківника [60].

Однією з моделей спонтанного коліту є розвиток патології у мишей *C3H/HeJBir* – підлінії мишей, які були виведені у Jackson Laboratory [61]. У цих тварин відтворюванню виникає спонтанний патогенез незалежний коліт з тяжким, хронічним ураженням й ульцерацією слизової оболонки сліпої та проксимального відділу товстої кишки. Проведення досліджень на цій підлінії мишей дозволило виявити, що важливими компонентами патогенезу захворювання були $CD4^+$ Т-лімфоцити, імунореактивність до кишкової мікробіоти, а не харчових антигенів. Автори наукових досліджень також зазначають, що використання *C3H/HeJBir* мишей у комбінації з моделями

індукованого коліту та з батьківською лінією можуть бути корисними для вивчення і визначення факторів генетичної схильності. Однак, використання даної моделі обмежується економічними факторами через високу вартість даної підлінії тварин. Крім того, роль генетично детермінованих факторів залишається не до кінця з'ясованою, що може дещо ускладнювати інтерпретацію результатів та їх екстраполяцію на людський організм [62].

Індуковані моделі коліту є одними з найбільш часто застосовуваних у доклінічних дослідженнях. Гостре або хронічне запалення кишківника у тварин може бути спровоковане різними чинниками, що опосередковують механічне або хімічне руйнування слизового бар'єру кишки. Відповідно до результатів досліджень, наведених у наукових джерелах, однією із вагомих причин розвитку патології за цих умов є активація імунологічних механізмів пошкодження слизової оболонки при контакті з антигенами порожнини кишківника. Дослідження у стерильних системах та на лабораторних тваринах, що отримували лікування хіміотерапевтичними засобами (антибактеріальними препаратами тощо), демонструють, що саме контакт із компонентами стінки бактеріальних клітин викликає патологічну імунну відповідь та виступає тригером у розвитку патологічних змін [63].

Формалінімунокомплексний коліт - експериментальна патологія, що відтворює гостре (до 5 днів) запалення слизової оболонки кишечника у кролів на тлі введення у дистальний відділ товстої кишки розведеного розчину формальдегіду [64]. Передбачається, що хімічне пошкодження епітелію призводить до запальної відповіді: інфільтрація гранулоцитами і макрофагами, що характеризується криптитом, деформацією крипт і некрозом слизової оболонки. На ділянках запалення відмічається високий рівень медіаторів, зокрема, простагландину E_2 , тромбоксану B_2 , лейкотрієну B_4 й C_4 та інтерлейкіну (IL)-1. Очевидно, що за умов моделювання цієї патології, провідна роль належить саме прозапальному IL-1, оскільки застосування антагоніста рецепторів IL-1 призводить до пригнічення прогресування коліту. В той же час, додаткові дослідження свідчать, що простагландин E_2 та деякі сенсорні

нейропептиди є есенціальними для репаративних процесів та реконвалесценції [65]. Таким чином, дана модель експериментального коліту може бути обрана, якщо метою роботи є дослідження прозапального компонента патогенезу та уточнення механізмів формування патології, проте для вивчення особливостей перебігу хронічної форми вона не є оптимальною.

Досить широко застосовується в експериментальних дослідженнях моделювання коліту, індукованого інтратректальним введенням оцтової кислоти гризунам та кролям, що призводить до пошкодження та підвищення проникності епітелію, наслідком чого є формування гострого слизового/трансмурального запалення дозозалежного характеру [66]. Перевагами даної моделі є відносно проста відтворюваність та можливість вивчення ранніх етапів запального процесу після пошкодження слизової оболонки кишки.

Останнім часом доведено, що деградовані полімери карагінану (харчової добавки E407) у питній воді мурчаків і мишей провокують запалення слизової оболонки сліпої кишки через тиждень застосування з подальшим поширенням по висхідному відділу товстої кишки через 3-6 тижнів [67]. Після видалення карагінану з питної води захворювання продовжує маніфестацію протягом 1-2 тижнів, а у випадку продовження утримання тварин на питній воді із карагінаном через 7-8 тижнів у тварин розвивається сепсис із практично 100 % летальністю [68]. Зазначена модель є прийнятною для вивчення механізмів формування гострого запального процесу, проте для доклінічного вивчення потенційних фармакокоректорів хронічного перебігу вона не підходить через особливості перебігу.

Авторами визначено, що підшкірне або пероральне введення щурам нестероїдного протизапального засобу - індометацину викликає хронічну ульceraцію та трансмуральне запалення тонкої кишки [69]. Ушкодження епітелію, спричинене індометацином, розвивається через дисбаланс про- та протизапальних медіаторів, зокрема, простагландину E₂, що відіграє важливу роль у синтезі глікозаміногліканів, що входять до складу слизового шару кишечника. Крім того нестероїдні протизапальні препарати ушкоджують

інтестинальний бар'єр, інгібують циклооксигеназу і руйнують мітохондрії, внаслідок чого мікроорганізми потрапляють до слизової оболонки кишки, де виділяють ліпополісахариди, що зв'язуються з Toll-подібним рецептором 4 і викликає надлишкову продукцію оксиду азоту й прозапальних цитокінів. У стерильних щурів (тварини, що були народжені і вирощені в умовах стерильного ізолятору) і щурів, які отримували антибактеріальні засоби, розвиток хронічного запалення кишечника не відбувається, що вказує також на роль нормальної ентеральної мікробіоти у профілактиці захворювання [70].

Одним із найбільш часто застосовуваних методів моделювання хронічного виразкового коліту у щурів є інтрамуральне введення компонентів клітинної стінки бактерій – пептидоглікан-полісахаридів (PG-PS) в дистальний відділ товстої кишки щурів, що індукує розвиток трансмурального ентероколіту. У тварин хронічний гранулематозний коліт з витонченням кишкової стінки та інфільтрацією лімфоцитами, макрофагами та нейтрофілами розвивається через 3-4 тижні. На четвертому тижні після введення компонентів клітинної стінки спостерігається розвиток артрити у щурів. PG-PS помітно підвищує проникність слизової оболонки й активність мієлопероксидази та активує продукцію NO і синтез колагену. Введення рекомбінантних антагоністів рецепторів IL-1 або IL-10 пригнічує маніфестацію патології, особливо на пізніх стадіях запалення та за хронізації процесу. Результати досліджень із застосуванням цієї експериментальної моделі показали, що компоненти клітинної стінки непатогенних інтестинальних бактерій можуть провокувати розвиток як гострого, так і хронічного коліту за рахунок пенетрації у стінку товстої кишки [71]. Додавання до раціону мишей або щурів декстран сульфату натрію (ДСН) у питній воді індукує розвиток гострого лівостороннього коліту з діареєю (характерним є наявність крові у фекаліях), ульцерацією та інфільтрацією нейтрофілами слизової оболонки товстої кишки [72]. Дослідження на лініях тварин, які мають підвищену чутливість до ДСН декількома циклами (7 днів ДСН, 7 днів вода) призводить до хронізації патологічного процесу з інфільтрацією макрофагами, CD4⁺ Т-лімфоцитами і пенетрацією виразок [73].

Пізні фази захворювання супроводжуються підвищенням рівня прозапальних інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8) і лейкотрієнів, що є ознаками залучення імунологічної ланки патогенезу. У дослідженнях із використанням цієї моделі було показано, що попереднє введення щурам з ДСН-індукованим колітом азоксиметану призводило до розвитку колоректальних пухлин переважно у зонах локалізації запального процесу у кишківнику [74].

Патогенетичні зміни, що розвиваються на тлі двох останніх експериментальних моделей, дозволяють проводити комплексне дослідження молекулярних механізмів розвитку патологічного процесу, оскільки імітують практично всі стадії перебігу коліту в організмі людини. Крім того, модель експериментального ДСН-коліту може бути використана для вивчення механізмів колоректального канцерогенезу, що є надзвичайно актуальним, зважаючи на широку поширеність цього серйозного ускладнення. Слід також зазначити, що дані моделі експериментального коліту є оптимальними з точки зору проведення доклінічних досліджень потенційних засобів медикаментозної корекції патології.

У чутливих ліній мишей, щурів і кролів можна застосовувати спосіб моделювання коліту, що базується на введенні у просвіт кишки розчину 2,3,6-тринітробензенсульфонової кислоти (ТНБС) або динітробензенсульфонової кислоти у 30-50 % етанолі [75]. Розвиток гострої, хронічної або летальної форми коліту сильно корелює із лінією тварин, яка використовується та потребує індивідуального підбору концентрації ТНБС. Гострий коліт у щурів супроводжується підвищенням проникності слизової оболонки внаслідок некрозу епітелію й підвищення активності мієлопероксидази у кишківнику. Велика кількість вогнищ ураження пов'язана зі зростанням кількості макрофагів та гранулоцитів.

Науковці характеризуються ТНБС/етанол-індукований коліт у лінії мишей SJL/J трансмуральним гранулематозним запаленням з важкою діареєю, прогресуючою втратою маси тіла та витонченням стінки кишечника. Хронічна стадія коліту супроводжується активацією імунної системи слизової оболонки і

супроводжується збільшенням ступеню інфільтрації лімфоцитами, особливо CD4⁺ [76]. Використання моделі ТНБС-індукованого коліту є доцільним у випадку, якщо метою дослідження є вивчення компонентів запального процесу, зокрема, секреція цитокінів, адгезія клітин та імунологічні механізми патології. За умов ТНБС-індукованого коліту спостерігається зростання рівня ІЛ-12 і фактору некрозу пухлин- α , а морфологічні ознаки є схожими за аналогічними показниками у пацієнтів з хворобою Крона. Проте, основним недоліком є необхідність використання чутливих ліній тварин, що може суттєво впливати на подальшу оцінку та інтерпретацію отриманих результатів. У науковій літературі також наявні дані щодо використання цієї моделі для вивчення ролі факторів, зокрема – стресу, що можуть провокувати загострення коліту [77].

Відомо, що сенсibilізація щурів за допомогою ректального введення та трансдермальної аплікації оксазолону призводить до формування запалення з пошкодженням слизової оболонки кишки, ульцерацією й зростанням активності мієлопероксидази. За даними авторів одноразове ректальне введення 50% спиртового розчину оксазолону мишам лінії SJL/J призводить до формування важкого коліту із втратою маси тіла і діареєю [78]. Запалення локалізується переважно у дистальному відділі кишківника, а гістологічна картина подібна до виразкового коліту у людини. Відповідно, дану модель можуть використовувати для оцінки прогресування патології за змінами гісто-морфологічної картини, проте основна складність полягає у необхідності використання виключно чутливих ліній тварин.

1.3. Морфологічні зміни за умов хронічних запальних процесів кишечника

Біопсійний матеріал, що отримується при проведенні ендоскопічних досліджень у хворих на ХК та НВК, є важливим джерелом інформації, на тлі якого встановлюється діагноз ЗЗК, проводиться диференціальна діагностика ХК

та НВК з іншими патологіями, оцінюється ефективність лікувальних заходів та активність перебігу захворювання.

Кишкова стінка без патологічних змін складається з чотирьох шарів – слизова оболонка (СО), підслизова основа, м'язова та серозна оболонки. СО в нормі має рівну поверхню з рівномірно розташованими криптами. Епітеліальні клітини (зрілі ентероцити та келихоподібні клітини) вистилають зовнішню поверхню та верхівки крипт, утворюючи завдяки щільним контактам клітинний бар'єр і не експресують антиген гістосумісності другого класу (МНС class II). Власна пластинка СО містить різні типи лейкоцитів. Лімфоцити представлені міжепітеліальними лімфоцитами, лімфоцитами власної пластинки та лімфоцитами лімфоїдних скупчень (асоційована зі слизовими оболонками лімфоїдна тканина, де формується імунна відповідь). Міжепітеліальні лімфоцити (Т-клітини, цитотоксичного фенотипу CD3+, CD8+) локалізуються між клітинами покривного епітелію. Лімфоцити власної пластинки представлені В-, Т-клітинами і невеликою кількістю натуральних кілерів (НК-клітини). Більшість Т-клітин власної пластинки за фенотипом є хелперами (CD3+, CD4+). У верхніх відділах власної пластинки локалізовані клітини моноцитарно-макрофагального походження (CD68+). Нейтрофільні лейкоцити в нормі відсутні [79].

Макро- та мікроскопічні зміни СО при ХК та НВК суттєво відрізняються. Макроскопічна картина при НВК різниться в залежності від стадії захворювання та активності запального процесу. В більшості випадків запальний процес локалізований у СО, тому стенози, фістули, потовщення кишкової стінки трапляються доволі рідко. В гострій фазі патологічного процесу спостерігається набряк СО (у важких випадках залучається підслизова основа) з формуванням численних виразок, що легко кровоточать при контакті, в криптах можуть формуватися мікроабсцеси. Виразки можуть підривати края СО з утворенням так званих слизових містків – «виразки за типом запонки». В стадії ремісії відбувається загоєння виразкових дефектів з формуванням псевдополіпів. Запалення може поширюватись на всі шари кишкової стінки, що може привести

до значного її потоншення з подальшою перфорацією – токсичний мегаколон [80].

Мікроскопічні зміни при НВК характеризуються специфічними змінами клітинного інфільтрату власної пластинки СО – зміна щільності (збільшення щільності клітинного інфільтрату внаслідок збільшення кількості клітин), складу і характеру розподілу (розподіл інфільтрату поширюється в нижні відділи СО і може охоплювати всю слизову). Дифузна моноцитарна інфільтрація з наявністю характерних гістологічних змін є важливою діагностичною ознакою [81]. Автори визначають наявність нейтрофілів: в інфільтраті з проявами пошкодження епітелію, наявність в епітелії крипт (криптит) та в просвіті крипт (криптоабсцес), що свідчить про активність запального процесу. Криптит та криптоабсцеси частіше зустрічаються при НВК. Характерними структурними змінами СО є зміна поверхні – вона стає нерівною, псевдворсинчастою, також може змінюватися структура крипт (вкорочення, брунькування) до їх повного зникання (атрофія СО). На поверхні СО при НВК з'являються ерозії (дефекти в межах СО) та виразки (виходить за межі власної пластинки, присутня грануляційна тканина і фібриноїдний некроз). В основі крипт з'являються клітини Панета (в нормі ці клітини присутні в СО сліпої кишки) і поява їх дистальніше у висхідному відділі ободової кишки є ознакою ЗЗК, а особливо НВК [82].

Макроскопічна картина при ХК характеризується: чергуванням уражених зон СО з незалученими до патологічного процесу, залученням усієї товщі кишки з потовщенням стінки і ураженням всіх оболонок, включаючи брижу. Слизова оболонка за ХК має характерний вигляд через те, що виразки можуть бути орієнтовані як вздовж, так і поперек на фоні набряку СО (вигляд бруківки). На початкових стадіях в СО виникають численні вузлики з ерозіями на поверхні. Потім ці ерозії зливаються з утворенням породільних виразок (змієподібні виразки). У міру прогресування патологічного процесу виразки стають щілеподібними з утворенням фістул з прилеглими органами та абсцесів. З фістулами часто асоційовані стриктури (циркулярні звуження просвіту з

потовщенням стінки кишки). Ще один феномен є специфічним для ХК, а саме жирове обгортання – розповсюдження жирової тканини брижейки на передню та задню стінку кишки в зоні ураження патологічним процесом [83].

У мікроскопічній картині головною діагностичною ознакою ХК є виявлення гранульом у гістологічних зрізах. Гранульома – це скупчення клітин моноцитарно-макрофагальної природи з іншими клітинами запалення. Макрофаги в гранульомах при ХК гігантських розмірів і мають назву епітеліоїдних клітин, що можуть експресувати на своїй поверхні антигени головного комплексу гістосумісності 2 класу. Також у гранульомах виявляються лімфоцити - $CD4^+$ Т-лімфоцити, що експресують рецептор CD28, ліганду до рецепторів CD86 та CD80. Гранульоми можуть виявлятися навіть у СО з незначними змінами. Локалізуються вони в усіх шарах кишкової стінки, але найчастіше в підслизовій основі. Іноді вони визначаються в регіонарних лімфатичних вузлах і навіть за межами шлунково-кишкового тракту (ШКТ) – позакишкові ураження. Не зважаючи на виключну діагностичну важливість виявлення гранульом, їх прогностичне та клінічне значення - не таке визначне [84].

1.4. Сучасні патогенетичні методи корекції змін при хронічних захворюваннях кишечника

З огляду на те, що НВК має рецидивуюче-ремітуючий характер перебігу, а також залежність перебігу від ступеня важкості патологічного процесу, підбір терапевтичної тактики має бути індивідуальним [85]. Етіологія та патогенетичні механізми НВК залишаються не до кінця з'ясованими, тому в основному проводиться симптоматична терапія, спрямована на досягнення довготривалої ремісії. Низький комплаєнс пацієнтів є суттєвою проблемою лікування. Це пов'язано з необхідністю довготривалого прийому препаратів, включаючи періоди ремісії, складний режим дозування на тлі часто низької ефективності. Неналежне слідування терапевтичним схемам з боку пацієнтів приводить до

збільшення частоти рецидивів, збільшення вірогідності розвитку ускладнень, що погіршує перспективи і збільшує потребу у довгостроковому амбулаторному чи стаціонарному лікуванні. Таким чином, постає очевидна потреба у пошуку способів удосконалення існуючих схем фармакологічної корекції задля підвищення їх ефективності і надійності з метою попередження виникнення загострення та побічних ефектів, а також розробка нових підходів до терапії [86].

Сучасні терапевтичні підходи у лікуванні НБК, викладені провідними фахівцями Німецького товариства гастроентерологів (DGVS), Американського коледжу гастроентерології (ACG), Європейською організацією хвороби Крона та коліту (ECCO) у клінічних настановах і рекомендаціях, полягають все ще у використанні підходу «піраміда», де базовим препаратом є 5-аміносаліцилова кислота, а стероїдні та імуномодулюючі препарати використовуються для підсилення. Інгібітори кальциневрину, інфліксимаб та хірургічне втручання розглядаються як «терапія спасіння» [87].

Вибір терапевтичної схеми залежить від ступеня активності, поширення, перебігу захворювання, наявності позакишкових проявів та наявності ефективності попереднього лікування (включаючи зручність прийому препаратів саме у цьому випадку). Ступінь активності захворювання і локалізація патологічного процесу визначається за Монреальською класифікацією: ремісія (S0) – 3 або менше дефекації на день без домішків крові; легкий ступінь (S1) – до 4 випорожнень на день, можливі домішки крові у калі; помірний ступінь (S2) – 4-6 випорожнень на день, наявність крові у калі, немає ознак системного ураження; важкий ступінь (S3) - більше 6 випорожнень на день, кров у калі й ознаки системного ураження (підвищення температури тіла та ЧСС, зниження гемоглобіну нижче 105 г/л, підвищення ШОЕ вище 30 мм/год). За цією ж класифікацією визначається і локалізація патологічного процесу: проктит (E1), лівосторонній коліт (E2) – ураження сигмовидної та низхідної ободової кишки, обширний коліт (E3) – панколіт [88].

На підставі визначених: ступеня важкості та локалізації патологічного процесу відбувається підбір медикаментозної терапії. Так, терапію проктиту

легкого та помірного ступеня важкості починають з топічних засобів (супозиторії, пінні клізми), що містять 5-аміносалицилову кислоту (5-АСК) у дозі 1 г/добу або місцеві кортикоїди (будесонід 2-8 мг/добу, гідрокортизон 100 мг/добу). Якщо терапевтичний ефект відсутній, то використовують терапію другої лінії – комбіновану: 5-АСК преорально 2-4 г/добу у поєднанні з топічними формами 5-АСК (месалазин) та/або місцевими стероїдами [89].

При лівосторонньому коліті легкого та середнього ступеня терапія включає місцеві аміносалицилати з пероральним прийомом месалазину у дозі до 2 г/добу. У випадку неефективності комбінованої терапії на протязі 14 днів, використовують системні стероїди перорально у дозі 40-60 мг одноразово протягом тижня, в подальшому дозу поступово зменшують – якщо доза преднізолону складала 40 мг, то після тижня такої терапії, наступного тижня прийом становить 30 мг/добу, потім 20 мг/добу впродовж місяця, після чого дозу зменшують до 5 мг/добу. Щоб уникнути побічних ефектів від прийому системних стероїдів були розроблені препарати для перорального прийому з переважним вивільненням у товстій кишці і низькою системною біодоступністю (будесонід, бекламетозону пропіонат), яким і надається перевага в терапії НВК. Важкий лівосторонній коліт є показанням для госпіталізації та призначення системної терапії [90].

Терапія поширеного коліту легкого та середнього ступеня важкості включає комплексне використання сульфосалазину у титрованій дозі 4-6 г/добу та месалазину місцево. Якщо ці терапевтичні заходи неефективні протягом 10-14 днів, призначають курс пероральних стероїдів. Якщо спостерігається стероїдна залежність або рефрактерна терапія для індукції ремісії призначають азатіопрін (2,5 мг/добу) або 6-меркаптопурин (1,5 мг/добу). Пацієнтів з важкою формою тотального коліту госпіталізують з проведенням інтенсивної терапії задля попередження розвитку токсичного мегаколону і перфорації. Терапія важкої форми НВК базується на внутрішньовенному введенні стероїдів – метилпреднізолону у дозі 60 мг/добу або гідрокортизону у дозі 400 мг/добу для індукції ремісії. У разі резистентності до пероральних форм преднізолону чи 5-

аміносаліцилової кислоти (5-АСК), призначають блокатор фактору некрозу пухлин- α (TNF- α) інфліксимаб у дозі 5 мг/кг. Якщо після 3 днів стероїдної терапії не спостерігається позитивні динаміка, розглядається рішення щодо проведення колектомії (тривалість стероїдної терапії понад 7 днів недоцільна через ризик виникнення побічних ефектів). Ефективність стероїдної терапії оцінюється за частотою дефекації, вмісту С-реактивного білка (СРБ) та результатами рентгенографії органів черевної порожнини на 3 добу.

Терапією другої лінії при неефективності терапії внутрішньовенними стероїдами та колектомії є інгібітори кальциневрину (CsA, такролімус) та інфліксимаб. CsA призначають у дозі 4 мг/кг для індукції ремісії, після чого до терапії додають імунодепресанти (наприклад, азатіоприн 2,5 мг/кг на добу) і виконують ступінчастий перехід на пероральний прийом такролімусу зі зменшенням дози протягом 3-6 міс. Такролімус застосовують перорально у дозі 0,1-0,2 мг/кг або внутрішньовенно у дозі 0,01-0,02 мг/кг. Пацієнтам, що отримують хіміотерапію, рекомендована хіміопрофілактика (триметопримсульфаметоксазол 160/800 мг двічі на день або інгаляції 300 мг пентамідину 1 раз на місяць) [91].

Інфліксимаб призначають для профілактики колектомії, а також у випадках резистентності пацієнтів до стероїдної терапії або терапії імуносупресорами. В клінічній практиці його використовують як препарат другого вибору через його довгий період напіввиведення. Інфліксимаб вводиться внутрішньовенно одноразово на 2 та 6 тижнів у дозі 5 мг/кг і надалі кожні 8 тижнів [92].

Терапія, спрямована на підтримку ремісії, спрямована на підтримку безстероїдної ремісії. Більш ніж у половини пацієнтів з НВК протягом року після загострення спостерігається рецидив захворювання. Пероральний прийом 5-АСК або ректально (при лівосторонньому коліті й проктиті) використовують як препарат першої лінії підтримки ремісії. У пацієнтів з супутніми суглобовими проявами рекомендована комбінація месалазину і сульфапіридину для індукції та підтримання ремісії. Пероральний прийом месалазину у дозі до 800 мг на добу

ефективний при поширеному коліті. Азатиоприн і 6-меркаптопурин у дозі 1,5-2,5 мг/кг на добу одноразово (під контролем клінічного аналізу крові з визначенням рівнів лейкоцитів) використовують як підтримуючу терапію у разі неефективності терапії аміносаліцилатами та у стероїдзалежних пацієнтів. Інфліксімаб також є ефективним для проведення підтримуючої терапії у пацієнтів, реагуючим на індукцію ремісії цим препаратом. Введення відбувається один раз на 8 тижнів у дозі 5 мг/кг внутрішньовенно [93].

Хірургічне лікування НВК проводиться в разі гострого перебігу хвороби або при тривалому прийомі стероїдів (преднізолон у дозі 20 мг/добу більше 6 тижнів) без ефекту, розвитку ускладнень (перфорація, токсична дилатація товстої кишки, абсцес, перитоніт тощо). Планове хірургічне втручання виконується в разі наявності показань до реконструктивної колектомії [94].

Як висновок можна сказати, що терапія НВК суттєво відрізняється в залежності від локалізації патологічного процесу, ступеня важкості, а також від особливості переносимості терапії в кожному випадку. Незручні схеми терапії, наявність побічних ефектів від застосовуваних препаратів знижують комплаєнс пацієнтів, що спонукає до пошуку нових схем та засобів терапії.

Терапевтична тактика ХК базується на визначенні ступеня активності (низька, помірна, висока) і локалізації запального процесу (тонка кишка, ілеоцекальна зона, товста кишка, стравохід та гастродуоденальна зона), перебігу захворювання (наявність кишкових та позакишкових ускладнень, відгук на терапію і побічні ефекти від неї).

ХК ілеоцекальної зони з низькою активністю може не потребувати медикаментозної терапії взагалі. Препаратом вибору є будесонід у дозі 9 мг/добу або месалазин у дозі 3 г/добу (доза залежить від ступеня тяжкості ХК). ХК ілеоцекальної зони помірної активності – призначається будесонід 9 г/добу. Також можуть бути призначені системні стероїдні препарати (дозування підбирається кожному пацієнту індивідуально впродовж тижня) або месалазин. Цитостатик метотрексат у комбінації з кортикостероїдами призначають при неефективності терапії. Пацієнтам з непереносимістю, залежністю або

резистентністю до кортикостероїдів, призначають інгібітори ФНП (фактору некрозу пухлин) – інфліксимаб у дозі 5 мг/кг, наступне введення через 4 тижні. У разі виявлених септичних ускладнень можуть призначатися антибіотики.

Лікування ЖК ілеоцекальної зони з високою активністю починається з призначення системних кортикостероїдних препаратів (преднізолон 40-60 мг/добу, при чому половину дози призначають внутрішньовенно, а половину - перорально). У випадку рецидиву до терапії кортикостероїдами можуть додаватися азатіоприн або меркаптопурин (через наявність стероїдзберігаючого ефекту). При непереносимості тіопуринів, призначається метотрексат. Якщо відсутній відгук на терапію препаратами першої лінії та неприйнятне оперативне втручання, призначають інфліксимаб. Антибіотики можуть бути призначені при наявності септичних ускладнень [95].

ЖК товстої кишки – рекомендовано призначення месалазину або при його неефективності - сульфасалазину у дозі 4 г/добу або системні кортикостероїди. Пацієнтам з рецидивом і помірною чи високою активністю призначають інгібітори ФНП в комбінації з імуносупресорами чи без них. Якщо рецидиви захворювання трапляються рідко, їм може бути призначена повторна терапія кортикостероїдами у поєднанні з імуносупресорами. До початку терапії імуносупресорами пацієнтам пропонують хірургічне видалення ураженої ділянки кишки. Поширена ЖК з локалізацією в тонкій кишці помірної або високої активності – призначають системні кортикостероїди або метотрексат. У разі рецидиву помірної чи високої активності призначають інгібітори ФНП. За умов поширеної ЖК рекомендована харчова підтримка, спеціальні харчові суміші. Рекомендоване хірургічне втручання на ранніх стадіях. У разі наявності ознак поганого прогнозу, пацієнтам рекомендоване раннє призначення метотрексату, інгібіторів ФНП чи їхньої комбінації [96].

При лікуванні ЖК стравоходу та гастродуоденальної зони рекомендовані інгібітори протонної помпи або їхня комбінація з системними кортикостероїдами або метотрексатом. При рефракторності або при тяжкому перебігу призначають інгібітори ФНП. Хірургічне лікування необхідне при появі

симптомів непрохідності [97]. Лікування ХК в залежності від перебігу: лікування рецидиву розпочинають з терапевтичної схеми, що була ефективною в перший раз (з урахуванням схильності пацієнта до неї, швидкості досягнення ремісії, час виникнення рецидиву, терапію супроводу тощо); у разі раннього рецидиву (що виник менше ніж за 3 міс після попереднього випадку) терапію починають з імуномодуляторів, якщо активність ХК помірна або висока, призначають інгібітори ФНП, що доцільніше робити, розпочинаючи з ранніх стадій лікування; при лікуванні ХК з резистентністю до кортикостероїдів проводиться з призначенням ФНП або комбінації ФНП з метотрексатом. Розглядається доцільність хірургічного втручання.

Хірургічне лікування рекомендовано при ХК в разі неефективності медикаментозної терапії та при наявності ускладнень, таких як абсцеси, нориці або стриктури [98].

Таким чином, значна поширеність хронічних запальних захворювань кишечника, висока летальність серед молодого працездатного населення, потенційно небезпечні ускладнення, зокрема розвиток колоректального раку, зниження якості життя хворих зумовлюють актуальність нашого експериментального дослідження: вивчення етіопатогенезу ЗЗК, визначення інформативних діагностичних критеріїв, а також обґрунтування застосування новітніх методів лікування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика біологічного об'єкту дослідження та дизайн експерименту

Дослідження проведені у 2019 – 2023 рр. на базі кафедри біологічної хімії (завідувачка – проф. О.А. Наконечна), Науково - дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини ХНМУ (в.о. директора – ст. н. с. Прокопюк В.Ю., угода №9 від 07 жовтня 2021 р.), Експериментальної біологічної клініки (керівник – О.В. Марченко) та кафедри патологічної анатомії (завідувач – проф. В.Д. Марковський, угода №6 від 11 листопада 2021 р.) Харківського національного медичного університету. Фрагменти дослідження виконувалися також на базі відділу наноструктурних матеріалів імені Ю.В. Малюкіна Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України (завідувач – член-кореспондент НАН України, проф. Єфімова С.Л., договір №173/09-19/н від 16 вересня 2019 р.), наукового центру патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету (завідувач – проф. Романюк А.М., договір № 179/09-20/н від 29 вересня 2020 р.).

Відповідно до завдань нашої експериментальної роботи було використано тридцять шість дорослих білих щурів обох статей популяції WAG віком 4 - 5 місяців, вагою 225-240 гр. Тварин було поділено на три рівні групи, по шість тварин у кожній (n=6) за методом випадкової вибірки з проведенням 2 серій експерименту. Щури були отримані з Експериментальної біологічної клініки Харківського національного медичного університету, пройшли акліматизацію протягом 21 доби. Експериментальних тварин утримували в алюмінієвих клітках (розмір 41x41x20 см) по 3 особини у клітці в стандартних умовах віварію: температура повітря у приміщенні складала $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, відносна вологість - $60 \pm 10\%$, освітлення - 300 Люкс. У роботі повністю було дотримано «Стандартні правила по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню

експериментальних біологічних клінік (віварій)». Тварини вживали щодобово 92-95 г кормової суміші. Протягом проведення експерименту щоденно ми контролювали загальний стан тварин, проводили зважування (визначали масу тіла кожної тварини), кількість вжитої їжі та випитої води, також спостерігали за станом та кольором калу, чи містять випорожнення кров. Усі експериментальні дослідження з щурами проводили в стандартних умовах віварію в однаковий час: з 9-00 до 12-00.

Контрольна група (n=6) складалася з інтактних тварин, що вживали чисту питну воду. Тварин годували стандартним раціоном, воду щури отримували *ad libitum*. Експериментальна група 1 (n=6) включала щурів з експериментальним хронічним колітом, викликаним пероральним введенням 2,5% розчину (вага / об'єм) декстрансульфату натрію (DSS, ДСН) (молекулярна маса: 40кДа; PanReac AppliChem, Німеччина) у питній воді за схемою: з 1-ї по 5-ту добу, з 13-ї по 17-ту добу, з 25-ї по 29-ту добу тваринам дослідної групи перорально вводили розчин DSS у питній воді; з 6-ї по 12-ту добу, з 18-ї по 24-ту, з 30-ї по 38-му добу щури отримували питну воду [99, 100]. На 39-й день тварин з цієї групи виводили з експерименту за допомогою гільйотинного ножа.

Друга експериментальна група (n=6) включала щурів, яким після експериментального моделювання хронічного коліту за допомогою декстрансульфату натрію, на 39 – ту добу корелювали патологічний стан пероральним введенням 0,5 мл 1% розчину діоксиду церію (CeO_2) протягом 14 діб. Щурів даної експериментальної групи (за умов корекції діоксидом церію патологічного стану) виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації на 54-ту добу.

2.2. Характеристика наночастинок діоксиду церію, що застосовувалися для корекції експериментального хронічного коліту

На сучасному рівні розвитку нанотехнологій є актуальним застосування в галузі біології та медицині нанорозмірних матеріалів, зокрема наночастинок

невеликих розмірів [101]. На сьогоднішній день увагу науковців привернув діоксид церію завдяки своїй біологічній активності та експериментально доведеного впливу на окислювально-відновнювальні процеси в клітині [102].

Церій відноситься до рідкоземельного елемента групи лантанодів. Унікальність застосування церію визначається у тому, що цей елемент існує у формах Ce^{2+} та Ce^{3+} , що забезпечують його участь в окисно-відновних реакціях. Діоксид церію (CeO_2) - це один з найважливіших рідкісноземельних оксидів, що привертає значний інтерес науковців протягом останніх років. Це пов'язано насамперед з легкою окисно-відновною здатністю церію та з іншими факторами, що впливають на ефективність наноматеріалів на основі CeO_2 . Матеріали на основі CeO_2 , що використовуються для біологічних та медичних застосувань, демонструють підвищену каталітичну та фотокаталітичну активність [103].

Наночастинки CeO_2 на сьогоднішній день використовуються в якості антиоксиданта в біології та медицині. Біологічна активність діоксиду церію обумовлена його кисневою нестехіометрією. Характерною для цього наноматеріалу є його біологічна сумісність, низька токсичність, каталітична активність, тому саме діоксид церію є найбільш перспективними наночастинками для біомедичного застосування [104].

У сучасній науковій літературі наразі є інформація щодо антиоксидантної дії CeO_2 . Характерним для визначних наночастинок є авторегенерація, участь у редокс-реакціях. Також існують відомості, що діоксид церію може виконувати роль ензимного міметика супероксиддисмутази та каталази, що належать до ферментативної ланки антиоксидантного захисту організму [105].

З досліджень відомо, що наночастинки CeO_2 меншого розміру є більш реакційно-здатними по відношенню до пероксиду водню. Розміри наночастинок діоксиду церію знаходяться в діапазоні від 7 до 20 нм. Дуже потужний антиоксидант діоксид церію здатний інактивувати АФК, нітрогену та нітрогенвмісні вільні радикали. Авторами доведено, що молекула діоксиду церія відрізняється великою рухливістю в кристалічній ґратці. Тому біологічна

активність CeO_2 залежить від не стехіометрії за киснем та розміру наночастинок. Таким чином доведено, що наночастинки CeO_2 мають антиоксидантні властивості та антибактеріальний захист.

У всіх тварин експериментальних груп проводився забір крові для подальшого проведення дослідження шляхом: проточної цитометрії, спектрофлуориметрії, імуноферментного аналізу, методу флуоресцентних зондів.

Експериментальних тварин, а саме щурів, утримували в стандартних умовах віварію та усі маніпуляції над ними проводили з урахуванням положень Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), переглянутих та доповнених у 2006 р., «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), Статуту Української асоціації з біоетики, норм GLP (1992) та типового положення з питань етики, регламентованого наказом МОЗ України від 23 вересня 2009р за № 690. Дотримувалися вказівок Директиви ЄС 2010/63/ЄС щодо захисту тварин, що використовуються в наукових цілях. Проведені експериментальні дослідження ухвалено Комітетом з біоетики ХНМУ згідно Закону України №3447-IV ст.26 ЗУ «Про захист тварин від жорстокого поводження» (протокол № 6 від 2 жовтня 2019 року).

2.3. Забір та обробка біологічного матеріалу, біохімічні показники та методи їх дослідження

Після виведення дорослих щурів з експерименту шляхом цервікальної дислокації у них проводився відбір зразків крові у вакутейнери з K_2EDTA (дикалієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) для запобігання згортання крові (IMPROVACUTER Evacuated EDTA K2 Spray Suated PET Tubs, Гуанчжоу, Китай). Зразки цільної крові щурів використовували для клінічного аналізу крові та приготування суспензії лейкоцитів з подальшим визначенням: генерації активних форм кисню в лейкоцитах, гранулоцитах, життєздатності та видів

їхньої клітинної смерті, стану мембран лейкоцитів зі застосуванням флуоресцентних зондів.

2.3.1. Проведення клінічного аналізу крові

Клінічний аналіз крові щурів визначали у цільній крові з ЕДТА на гематологічному аналізаторі Micros 60 ABX (Франція) (прибор використовує 10 мкл цільної крові), морфологічну оцінку клітин крові та підрахунок лейкоцитарної формули проводили за допомогою мікроскопу ВІО Blue за загальноприйнятою методикою. Сироватку крові отримували з цільної крові щурів шляхом центрифугування з використанням центрифуги «Universal 320» (Німеччина) при 3000 об/хв. протягом 15 хвилин. Отриману сироватку крові заморожували в декількох пробірках епендорф та зберігали у низькотемпературній морозильній камері Haier «Ultra Low Temperature» (Китай) при $t = -5^{\circ}\text{C}$, перед проведенням біохімічного дослідження сироватку крові розморожували.

У ході дослідження згідно завдань, поставлених у роботі, сироватку крові використовували для визначення вмісту 8-ізопростану як основного біохімічного маркера ліпідної пероксидації та оксидативного стресу, маркерів запального процесу, зокрема прозапальних інтерлейкінів: IL-1 β , TNF- α та протизапального - IL-10, імуноферментним методом.

Також нами проводився забір фрагментів відділів тонкої та товстої кишки для подальшого розведення морфологічних та імуногістохімічних досліджень.

2.3.2. Визначення вмісту 8-ізопростану у сироватці крові

Визначення основного біохімічного маркера оксидативного стресу – 8-ізопростану у сироватці крові щурів визначали за допомогою наборів реактивів «8-isoprostane EIA KIT» (Cayman Chemical, USA) імуноферментним методом. Одиниці вимірювання – пг/мл.

Принцип методу: конкуренція між основним біохімічним маркером оксидативного стресу та 8-ізопростан-холінестеразою за зв'язування з

обмеженою кількістю 8-ізопростан специфічних анти сироваткових сайтів. Кожен зразок крові аналізували у двох розведеннях.

Для визначення вмісту 8-ізопростану в сироватці крові використовували спектрофотометр «Solar» PV-1251 C за довжиною хвилі 412 нм.

2.3.3. Визначення основних біохімічних маркерів ензиматичної ланки антиоксидантної системи

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) у сироватці крові експериментальних тварин визначали за допомогою імуноферментного методу з використанням набору для визначення вмісту каталази «Catalase ELISA Kit» (Elabscience, Cloud-Clone Corp., USA). Для визначення активності каталази використовували імуноферментний аналізатор «Stat Fax 1904». Активність ензиму в сироватці крові щурів визначали в U/ml;

Принцип методу визначення активності каталази в крові полягав у зменшенні кількості перекису водню в пробі.

Хід дослідження: у стандартні лунки для формальдегіду ми додавали 100 мкл буферу, 30 мкл метанолу та 20 мкл стандарту. До лунок позитивного контролю додавали 100 мкл буфера для аналізу каталази (1X), 30 мкл метанолу та 20 мкл розведеної каталази (контроль) у дві лунки. До лунок, що містили зразки крові (20 мкл) додавали 100 мкл буфера для аналізу каталази (1X), 30 мкл метанолу. Зразки крові розводили за допомогою буферу Catalase Sample Buffer. Далі ми додавали 20 мкл розчиненого пероксиду водню до всіх лунок для початку реакції. Протягом 20 хвилин інкубували суміш реагентів при кімнатній температурі. Потім додавали 30 мкл гідроксиду калію в кожен лунку для закінчення реакції, вносили 30 мкл Catalase Purpald (Chromogen) до кожної лунки. Далі ми проводили повторне інкубування протягом 10 хвилин при $t=23-25^{\circ}\text{C}$. До кожної лунки вносили 10 мкл періодату калію з інкубацією протягом п'яти хвилин при кімнатній температурі. Активність каталази у сироватці крові щурів визначали на спектрофотометрі «Solar» PV-1251 C за $\lambda=540$ нм.

Активність супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) визначали імуноферментним методом за допомогою набору «SOD1 (Superoxide Dismutase 1) ELISA Kit» (FineTest, США) згідно інструкції виробника. Активність супероксиддисмутази в крові щурів визначали в U/ml.

Принцип методу: вимірювання ефекту гальмування ензимом процесу окиснення кверцетину за допомогою кисню.

Хід дослідження: спочатку розводили сироватку крові в пропорції 1:20 за допомогою 1X PBS (10 мкл зразка до 190 мкл 1X PBS). Далі проводили промивку мікропланшету двічі, застосовували для цього 400 мкл 1X промивного буферу. Перед аспірацією буфер залишали в лунках на 10-15 секунд. Далі додавали 100 мкл стандартів у відповідні лунки. До лунок додавали 90 мкл 1X PBS, з подальшим додаванням проб. Вносили 10 мкл зразків у відповідні лунки, додавали 50 мкл кон'югату HRP з подальшим інкубуванням протягом 3 годин при кімнатній температурі. Вносили 100 мкл розчину субстрату ТМВ, інкубували смужки мікропланшетів при кімнатній температурі (18-25°C) протягом 10 хвилин. Зупиняли реакцію за допомогою 100 мкл Stop розчину. Результати отримували за допомогою спектрофотометру «Solar» PV-1251С за $\lambda=450$ нм.

2.3.4. Визначення вмісту в сироватці крові щурів основних цитокінів

Вміст цитокінів TNF- α , IL-1 β , IL-10 у сироватці крові визначали за допомогою діагностичних тест-систем методом твердофазного імуноферментного аналізу. Визначення біохімічних параметрів в крові проводилось згідно інструкцій до наборів. Реєстрували оптичну щільність зразків крові після проведення процедури. Для цього використовували імуноферментний аналізатор Awareness Technology Stat Fax 303 Plus (USA). Будували калібрувальну криву, де було відображено залежність оптичної щільності від концентрації для стандартного антигену. За допомогою калібрувальної кривої проводили кількісну оцінку отриманих результатів.

Вміст прозапального IL-1 β у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за набором реактивів «IL-1 β ELISA KIT» (Abscam, USA). Вміст було виражено в пг/мл.

Принцип методу: зв'язування стрептавидін - HRP з біотин - кон'югованим антитілом до IL-1 β . У роботі використовували спектрофотометр «Solar» PV-1251 С за довжиною хвилі 450 нм.

Вміст прозапального TNF- α у сироватці крові визначали твердофазним імуноферментним методом з використанням наборів реактивів фірми «LDN».

Принцип методу оснований на зв'язуванні моноклональних антитіл з різними епітопами TNF- α . Зв'язані мічені ензимами антитіла вимірювали за допомогою хромогенної реакції. У роботі використовували спектрофотометр «Solar» PV-1251 С за довжиною хвилі 450 нм.

Вміст протизапального IL-10 у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом з використанням наборів фірми «IBL International» (Німеччина) та виражали у пг/мл.

Принцип методу: зв'язування IL-10 в зразках крові з антитілами, що були адсорбовані на мікропланшеті. У роботі використовували спектрофотометр «Solar» PV-1251 С за довжиною хвилі 450 нм.

Визначення вмісту профібротичного фактору MCP-1 у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом з використанням набору «eBioscience» (Відень, Австрія), вміст виражали у пкг/мл.

Принцип методу: в лунки мікропланшета для ІФА, покритий антитілами, специфічними до щурячого MCP-1, вносили зразки сироватки, біотинільоване антитіло, специфічне до щурячого MCP-1, і кон'югат авідін-пероксидази хрому (HRP) і інкубували. Далі промивали, видаляли вільні компоненти. До кожної лунки вносили розчин субстрату. Лунки, що містили щурячий MCP-1, біотинільоване та кон'югат Avidin-HRP, забарвлювалися в синій колір. Фермент-субстратну реакцію зупиняли додаванням стоп-розчину і колір ставав жовтим. Оптичну густину (OD) вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 450

нм \pm 2 нм. Концентрація щурячого MCP-1 була пропорційною значенню OD. Розрахунок проводився, порівнюючи OD зразків зі стандартною кривою.

Визначення вмісту серпіну A4 у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за допомогою набору «Elabscience» (USA) з використанням імуноферментного аналізатора Stat Fax 1904, вміст нг/мл.

Принцип методу: в лунки мікропланшета для ІФА, покритого антитілами, специфічними до щурячого серпіну A4, вносили по 100 μ л зразків сироватки та інкубували протягом 2,5 годин при температурі 4° С, потім додавали в кожен лунку по 100 μ л біотинильованого антитіла, специфічного до щурячого серпіну A4, та інкубували 1 годину при кімнатній температурі, після чого в кожен лунку додавали по 100 μ л розчину кон'югату HRP Streptavidin, після інкубації 45 хв при кімнатній температурі в кожен лунку додавали по 100 μ л розчину субстрату та інкубували 30 хв при кімнатній температурі, після чого в кожен лунку додавали по 50 μ л стоп-розчину. Лунки, що містили щурячий серпін A4, забарвлювалися в синій колір, а після додавання стоп-розчину – у жовтий. Оптичну густину (OD) вимірювали спекто-фотометрично при довжині хвилі 450 нм \pm 2 нм. Концентрацію серпіну A4 у сироватці розраховували, порівнюючи OD зі стандартною кривою.

2.3.5. Отримання суспензії лейкоцитів крові щурів з подальшим проведенням проточної цитофлуометрії для аналізу життєздатності та видів клітинної смерті лейкоцитів, стану мембран за допомогою флуоресцентних зондів

Зразки цільної крові щурів використовувалися для отримання суспензій лейкоцитів відповідно протоколу проведення процедури лізування - промивання. У пробірку з полістиролу (розмір 12 x 75 мм) (Falcon, 5 ml Polysterene Round-Bottom Tube, Corning Science Mexico, S.A. de C.V., Mexico) додавали 100 мкл крові, отриманої від кожної експериментальної тварини. Для приготування суспензії лейкоцитів аліквоти крові (100 мкл), що були отримані від кожної тварини, лізували та двічі відмивали розчином Pharmlyse (Becton Dickinson, Сан-

Хосе, США) та фосфатно-буферним розчином (PBS) відповідно. За протоколом отримання суспензії лейкоцитів крові: до пробірок додавали 2 мл 1x FACSLyse розчину (BD FACS™ Lysing Solution, Becton, Dickinson and Company BD Biosciences, 9029989, Сан Хосе, США). Отримані розчини перемішували за допомогою вортекса. Протягом 15 хвилин проби інкубували в темряві за умов кімнатної температури 22-24°C з подальшим центрифугуванням на центрифугі «Universal 320» (Німеччина) при 500g протягом 5 хвилин. Супернатант зливали та додавали 2 мл натрій-фосфатного буферу (PBS, pH 7,4; BDTM Cell Wash, Польща). Визначені дії повторювали двічі. Суспензії лейкоцитів використовували для подальшої оцінки генерації АФК у життєздатних лейкоцитах, а також для аналізу видів їхньої клітинної загибелі.

2.3.6. Оцінка життєздатності та видів клітинної загибелі лейкоцитів за умов фарбування суспензії лейкоцитів крові щурів анексином V FITC та 7-AAD

Для визначення життєздатності ядровмісних білих клітин периферичної крові, видів їхньої клітинної смерті, зокрема апоптозу, некрозу використовували метод проточної цитометрії за допомогою проточного цитофлюориметру BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США). Для обробки результатів було використано програмне забезпечення BD FACSDiva™ та FlowJo™ v10.8.

Оцінка видів клітинної смерті проводилася шляхом одномоментного додавання маркерів: FITC-міченого анексіну V, фікоеритрин–мічених мишиних моноклональних антитіл до CD45 та 7-аміноактиноміцину (7-AAD). У дослідженні використовували 5 мкл анексіну V, по 10 мл 7-AAD та CD45.

За протоколом проведення процедури після лізування еритроцитів та їхнього подальшого дворазового відмивання клітини ресуспендували за допомогою 1 мл 1x анексин - зв'язуючого буфера (BD Pharmingen™ Annexin V Binding Buffer, партія 8145742, BD Biosciences, Сан-Хосе, США). За протоколом проведення дослідження аліквоти суспензій лейкоцитів (100 мкл) інкубували з анексином V, що був міченим флуоресцеїном ізотіоціанатом (FITC) (BD Pharmingen™ FITC-Annexin V, партія 8311824, BD Biosciences, Сан-Хосе, США).

Обробка отриманих результатів: гейтинг популяцій CD45⁺-клітин, гранулоцитів та життєздатних лейкоцитів.

та додавали до суспензій лейкоцитів 5 мкл 7-аміноактиноміцину D (7-AAD, BD Pharmingen™, партія 8263992, BD Biosciences, Сан-Хосе, США). Після закінчення інкубації, що тривала 20 хвилин, додавали 400 мкл 1x анексин-зв'язуючого буфера.

Для подальшої ідентифікації області гранулоцитів та життєздатних лейкоцитів використовували SSC/FL6 дот плоти після фарбування антитілами миші до щурячого CD45, що були мічені флуорохромом APC-Cy™7 (BD Pharmingen, No 561586, клон ОХ-1, США). Стратегія виділення популяцій життєздатних клітин продемонстровані на рис. 2.1.

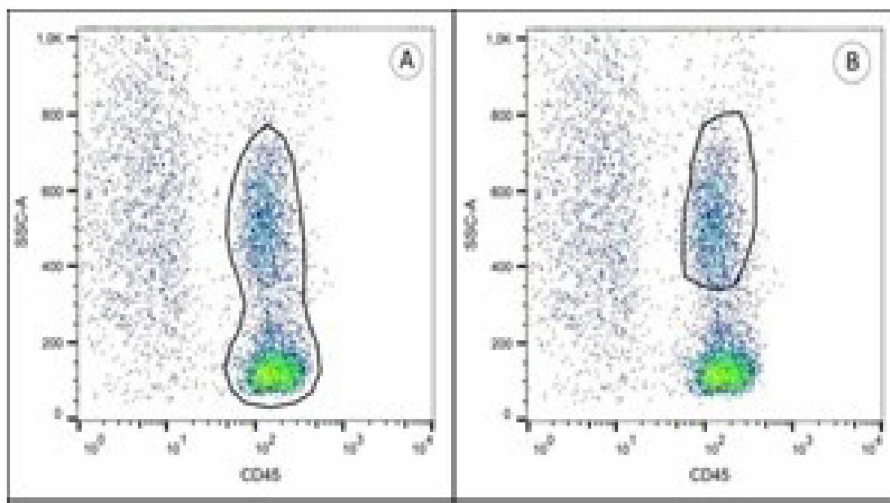


Рисунок 2.1. Стратегія для виділення популяцій CD45⁺-клітин (A), гранулоцитів (B) в периферичній крові щурів.

У гейтованих регіонах були визначені життєздатні клітини крові, що були негативно забарвлені 7-AAD. Відомо, що цей флуоресцентний барвник зв'язується з ДНК в ядрі клітини за умов порушення цілісності ядерної мембрани, таким чином 7-AAD може потрапити до клітини. Флуоресценцію 7-AAD визначали в каналі FL-3. На рис.2.2 показано на прикладі ідентифікацію життєздатних лейкоцитів.

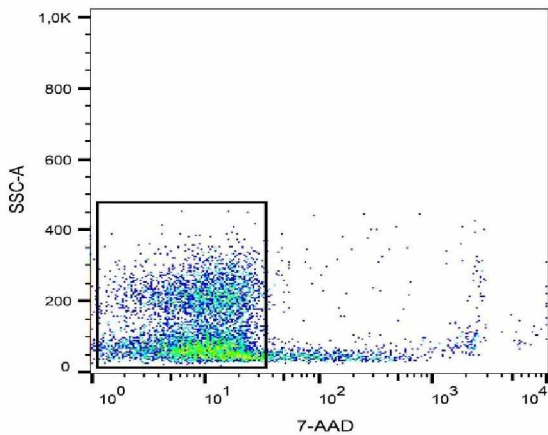


Рисунок 2.2. Ідентифікація життєздатних клітин шляхом визначення популяції 7-AAD-негативних клітин. Прямокутник - регіон життєздатних лейкоцитів.

Аналіз результатів фарбування анексин V-FITC та 7-AAD

Відомо, що анексин V-FITC оптимально збуджується при 494 нм і має пікове випромінювання при 519 нм. Таким чином, флуоресценцію вимірювали на стандартному каналі FITC (детектор FL1). 7-AAD збуджується при 488 нм і випромінює приблизно при довжині хвилі 670 нм. Його флуоресценція визначалася на каналі FL3. Шляхом додавання маркерів (FITC – міченого анексину V та 7-аміноактиноміцину - 7-AAD) ми проводили оцінку життєдіяльності та видів клітинної смерті. Для оцінки результатів застосовували критерії Крускала-Уолліса з подальшим використанням критерію Данна для порівняння цифрових значень середньої інтенсивності флуоресценції.

Аналіз лейкоцитів, забарвлених анексином V та 7-AAD, дозволив ідентифікувати чотири типи клітин: 1 - життєздатні клітини (анексин V⁻, 7-AAD⁻); 2 – клітини у стадії раннього апоптозу (анексин V⁺, 7-AAD⁻); 3 - клітини у стадії пізнього апоптозу (анексин V⁺, 7-AAD⁺); 4 - некротичні клітини (анексин V⁻, 7-AAD⁺). Оцінку отриманих результатів проводили за допомогою програм «BD Cell Quest Pro» та «WinMDI Version 2.0».

2.3.7. Визначення генерації АФК лейкоцитами методом проточної цитофлуометрії за допомогою барвника H₂DCFDA

До суспензії лейкоцитів додавали індикатор вільних радикалів - H₂DCFDA (Invitrogen™, США), що широко використовується для визначення внутрішньоклітинного вмісту АФК. Кінцева концентрація складала 5 мкМ. Робочий розчин H₂DCFDA готували з його вихідного розчину в ДМСО (10 мМ). Лейкоцити інкубували при t=37 °С протягом 30 хв., потім суспензії клітин інкубували з 10 мкл антитіл миші до щурячого CD45, що були мічені флуорохромом APC-Cy™7 (BD Pharmingen, No 561586, клон ОХ-1, США) та 5 мкл 7-AAD (BD Pharmingen, No 559926, США). Ця процедура проводилася для визначення життєздатних лейкоцитів.

За протоколом дослідження зразки крові аналізували за допомогою проточного цитометра FACS Canto II (BD Biosciences, США) з використанням каналу FL-1. Виявляли флуоресценцію 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїну (ДХФ), що є барвником, чутливим до генерації АФК, що синтезується внутрішньоклітинно за дією АФК після попереднього впливу естераз з H₂DCFDA. Використовували програмне забезпечення BD FACSDiva™ (Becton Dickinson, США), визначали середню інтенсивність флуоресценції ДХФ для кількісної оцінки внутрішньоклітинної продукції АФК. Флуоресценцію ДХФ вимірювали у CD45⁺ та 7-AAD⁻ клітинах в усіх експериментальних тварин.

2.3.8. Дослідження стану цитоплазматичних мембран лейкоцитів

Дослідження проводили з використанням флуоресцентних зондів. Для дослідження застосовували спектрофлуориметр «Hitachi 4010».

Використання флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей мембран лейкоцитів крові експериментальних тварин

Кров інтактних щурів у кількості 2 мл крові збирали у вакутейнери з K2EDTA для запобігання згортання. Об'єм, отриманий від кожного щура, порівну розподілявся між чотирма пробірками з полістиролу, тобто по 500 мкл крові на зразок. Зразки (суспензії лейкоцитів крові щурів) інкубували з відповідними

зондами: О6О (2-(2'-гідрокси-феніл)-5-(4'-біфеніл)-1,3-оксазол); О1О (2-(2-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол); РН7 (2-(2'-гідрокси-феніл)-фенантро[9,10-d]-1,3-оксазол) та РН1 (2-фенілфенантро [9,10-d] -1,3-оксазол).

Відомо, що основні параметри флуоресценції зондів залежать від полярності та протонодонорної здатності мікросередовища [106]. За даними авторів, зонд О1О розташовується у ділянці голівок фосфоліпідів (ближче до центру ліпідного бішару) та карбонільних груп фосфоліпідів в ділянці жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, прилеглих до ділянки карбонільних груп (рис. 2.3).

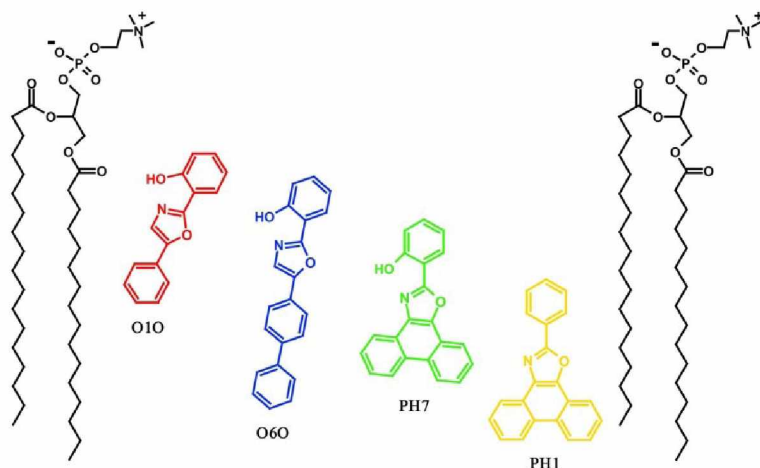


Рисунок 2.3. Фосфоліпідний бішар мембрани лейкоцитів: локалізація та орієнтація флуоресцентних зондів О1О, О6О, РН7 та РН1 у мембрані клітин. Дві молекули фосфоліпідів зі зовнішнього шару фосфоліпідної мембрани представлені для кращої візуалізації.

Відомо, що флуоресцентний зонд О6О розташований в зоні карбонільних груп та вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів поблизу полярної області фосфоліпідного бішару мембрани, тоді як зонд РН7 локалізується у зоні вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів ближче до центру ліпідного двошару клітинної мембрани (рис. 2.3). Передбачувана локалізація зонда РН1 в фосфоліпідних компонентах клітинних мембран: регіон жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів та їх кінцевих метильних груп, зокрема гідрофобна

ділянка фосфоліпідного бішару (рис. 2.3). За умов перебування зондів у збудженому стані відбувається транспорт протонів [107]. З утворенням фототаутомерної форми (T^*). Флуоресцентний фотопродукт визначається на значно більшій довжині хвилі у порівнянні з початковою («нормальною») формою (N^*) [108].

Завдяки наявності двосмугової флуоресценції використовується співвідношення інтенсивностей флуоресценції фототаутомерної форми до початкової форми (I_{T^*}/I_{N^*}) як параметр, що використовується для оцінки змін фізико-хімічних властивостей мікросередовища. Визначено, що зі зростанням полярності та/або протонодонорної здатності носія, співвідношення I_{T^*}/I_{N^*} зменшується [109]. При збільшенні гідратації фосфоліпідного бішару клітинної мембрани відбувається підвищення протонодонорної здатності та полярності середовища, тому флуоресцентні зонди використовують для виявлення змін [110]. Завдяки порушенням гідратації клітинних мембран виникають зміни впорядкованості мембранних ліпідів, тому флуоресцентні зонди можуть використовуватися для оцінки й цього параметру [111].

У ході проведеного нами експериментального дослідження лейкоцити флуоресцентно мітили зондами. Флуоресцентні зонди розчиняли в ацетонітрилі до початковій концентрації 2×10^{-4} моль/л. Аліквоту вихідного розчину зонда в ацетонітрилі додавали до суспензії лейкоцитів з метою досягнення кінцевої концентрації зонда біля 5×10^{-6} М/л. Молярне відношення ліпідів до зонду становило приблизно 200 до 1. Перед проведенням вимірів флуоресценції суспензії лейкоцитів інкубували з флуоресцентними зондами при кімнатній температурі протягом години. Спектри флуоресценції в суспензіях лейкоцитів, отриманих з крові інтактних тварин та щурів, яким індукували розвиток хронічного коліту, реєстрували на флуоресцентному спектрометрі «Thermo Scientific Lumina» виробництва фірми «Thermo Fisher Scientific» (Волтем, США), у діапазоні 350-630 нм з кроком 0,1 нм. Дані збиралися з інтервалом 0,02 с. Щілини на збудливому та емісійному монохроматорах становили 5 і 10 нм відповідно. Довжина хвилі збудження дорівнювала 330 нм.

2.3.9. Морфологічне дослідження фрагментів тонкої та товстої кишки

У кінці проведення експерименту після декапітації щурів проводився забір фрагментів тонкої та товстої кишки, які відразу піддавалися перфузії фізіологічним розчином. Отримані фрагменти кишки піддавалися фіксації в 10 % розчині нейтрального формаліну, спиртовій проводці. Ущільнення тканин, що перебували у розчині формаліну, досягали проведенням через спирти зростаючої концентрації. Виготовляли парафінові зрізи. Отримані зрізи товщиною 5 мкм та препарати фарбували гематоксилин-еозином, галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном, пікрофуксином за ван Гізоном, ставилась ШИК-реакція відповідно до стандартних гістологічних описів.

Мікроскопія препаратів здійснювалася на мікроскопі «Axiostar plus» (Zeiss, Німеччина) за умов проведення світлового мікроспіювання.

Імуногістохімічне дослідження експресії білка Ki-67 і маркерів CD3 та CD68

Зразки фрагментів товстої кишки, що були зафіксовані формаліном, проведені у спиртах та залиті у парафін, мікротом використовували для отримання зрізів товщиною 5 мкм. Імуногістохімічний аналіз (ІГХ) проводився шляхом непрямой імунопероксидазної реакції з використанням щурячих моноклональних антитіл до Ki-67 фірми «Thermo Fisher Scientific» (США). Після інкубації з первинними антитілами обробляли кон'югатом з анти-мишачим IgG з наступним фарбуванням за допомогою антитіл до Ki-67. Для проведення імуногістохімічної реакції зрізи розміщували на слайдах, покритих 3-амінопропілтріетоксисіланом. Виявлення антигену проводили на водяній бані при температурі 95–97° С згідно зі стандартним протоколом. Слайди інкубували з антитілами до CD3 та CD68 відповідно. Візуалізацію проводили за допомогою системи детектування «UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromatogen» (Thermo Scientific, США). Коричневе фарбування вважалося позитивним. Морфометричні дослідження проводились з використанням програми «Olympus DP-soft 3.12 »

Зображення були зроблені за допомогою мікроскопа «Axiostar-plus» (Zeiss, Німеччина).

*Кількісне визначення експресії маркерів при використанні
імуногістохімічного аналізу*

Кількість імунореактивних клітин у власній пластинці кишківника визначали у зонах фіксованого розміру (250x250 мкм). У кожному зразку було проаналізовано п'ять таких випадкових областей для підрахунку макрофагів (CD68-позитивних клітин), Т-лімфоцитів (CD3-позитивних клітин), клітин, що експресують фасцин, віментин та Е-кадгерин. Клітини, зафарбовані коричневим кольором, вважали позитивними щодо експресії відповідних маркерів.

Оцінювали та порівнювали кількість CD3⁺ та CD68⁺ клітин на фіксовану площу. Ми розраховували співвідношення CD68⁺ клітин / CD68⁻ клітин та CD3⁺ клітин / CD3⁻ клітин. Кількість клітин, які експресують маркери ендотеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) у аналізували таким же чином. Крім того, кількісно аналізували експресію віментину в стромальних клітинах та епітеліальному шарі кишківника. За допомогою світлової мікроскопії визначали відносну інтенсивність коричневого забарвлення 3,3'-діамінобензидину (ДАБ). Була застосована система оцінки імунофарбування, заснована на визначенні освітленості ділянок, утворених кількома позитивно забарвленими епітеліальними клітинами та одиничними імунореактивними стромальними клітинами. Вираховували логарифми отриманих числових значень. Результати були виражені в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ).

2.4. Статистична обробка даних

Статистичну обробку отриманих в дослідженні даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «GraphPad Prism 5» software. Для порівняння показників двох незалежних груп використовували непараметричний критерій Mann-Whitney. За умов непараметричного U критерію отримані цифрові результати представляли у вигляді медіани (Me) та інтерквартильного розмаху (25%;75%). Різниця між групами вважалася статистично значущою при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ В КРОВІ ОСНОВНИХ ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНО-АНТИОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ ЛЕЙКОЦИТІВ ТА ФІБРОЗУ

Відомо, що клінічний аналіз крові відображує процеси, що відбуваються в цілому організмі. Клітини крові відіграють значну роль у специфічній та неспецифічній імунній відповіді організму на вплив різноманітних факторів та розвиток патологічних станів. У патогенез хронічного коліту залучається імунна система [112]. В імунній відповіді важливе місце займають фагоцитарні реакції за участю макрофагів - моноцитів крові та мікрофагів – нейтрофілів периферичної крові. Моноцитарно-макрофагальна система запускає та регулює механізми імунної відповіді, захищає організм від чужорідних речовин, зокрема від потрапляння декстран сульфат натрію, патогенної мікробіоти. Завдяки імунній системі з залученням фагоцитів – клітин крові підтримується імунна відповідь та відбувається синтез цитокінів, зокрема прозапальних.

Процес фагоцитозу за умов залучення популяцій лейкоцитів забезпечується фізіологічними механізмами, що пов'язані з активацією кисню вільними радикалами та формуванням активних форм кисню (АФК). Особливо цей процес відбувається за умов дії різноманітних шкідливих факторів, потрапляння до організму різноманітних речовин, зокрема ДСН.

За фізіологічних умов активні метаболіти кисню утворюються при роботі дихального ланцюга на внутрішній мембрані мітохондрій, ензимів НАДФ(Н) – залежних оксидаз, мієлопероксидази, метаболітів арахідонової кислоти. Наприклад, мієлопероксидаза є ключовим ензимом у функціонуванні нейтрофільних гранулоцитів, приймає участь у реакції окиснення субстратів йонами хлориду або пероксиду гідрогену з утворенням гіпохлористої кислоти, тощо.

3.1. Клінічний аналіз крові щурів експериментальних груп

Почнемо характеристику отриманих результатів з клінічного аналізу крові саме з лейкоцитів. Отримані результати дослідження представлено у табл.3.1. Лейкоцити (WBC) крові виконують захисну функцію, забезпечують імунний статус організму, протистоять патогенним бактеріям.

Таблиця 3.1

Лейкоцитарна формула крові щурів контрольної та експериментальних груп (Me [25%;75%])

Групи	Медіана	25% перцентиль	75% перцентиль
Лейкоцити, $10^9/l$			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	4,950	4,525	5,125
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	8,050** p=0.0022	7,700	8,725
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	4,850** p ₁ =0.0022	4,450	5,250
Лімфоцити, $10^9/l$			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	3,700	2,975	3,825
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	5,850** p=0.0049	5,325	6,175
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	2,950 p ₁ =0.005	2,775	3,125
Моноцити, $10^9/l$			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	0,3000	0,2000	0,4000
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	0,9500** p=0.0048	0,7750	1,025
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	0,50 p=0.0275; p ₁ =0.0048	0,375	0,600
Гранулоцити, $10^9/l$			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	1,050	0,9750	1,125
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	1,400** p=0.0046	1,375	1,625
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	1,550 p _{1,2} >0,05	1,075	1,725

Примітка: ** - $p < 0,01$ - достовірність відмінностей у порівнянні з відповідними показниками контрольної групи; p₁ < 0,01 - достовірність відмінностей у порівнянні з показниками у щурів з експериментальним хронічним колітом.

Білі кров'яні клітини поділяють на гранулоцити (нейтрофіли, еозинофіли та базофіли) та агранулоцити (моноцити та лімфоцити). Нейтрофільні

гранулоцити виконують наступні функції в організмі: хемотаксис, фагоцитоз та секрецію. Ці гранулоцити не мають антигенпрезентуючої функції, в організмі виконують функції клітин - ефektorів. Вони здатні до здійснення фагоцитозу, але в меншій мірі, у порівнянні з макрофагами крові - моноцитами. Нейтрофіли складають 47-72 % від усіх лейкоцитів, приймають участь в процесах фагоцитозу мікроорганізмів, є макрофагами.

За морфологією лейкоцити мають сегментоване ядро, ендоплазматичний ретикулум, в структурі вони не мають рибосом, тому протеїни в лейкоцитах не синтезуються. Мають незначну кількість біохімічних фабрик клітини - мітохондрій, однак лейкоцити мають багато різних гранул, що містять різні ферменти: гідролази, пероксидази, лужну фосфатазу, лізоцим, білки – катіонні, лактоферин та інші. Основним джерелом енергії для нейтрофілів є основний моносахарид - глюкоза, що може перетворюватися в пентозофосфатному шляху (біля 10 %), реакціях гліколізу (90 %) або запасатися у вигляді полісахариду - глікогену.

При аналізі лейкоцитарної формули крові щурів було визначено, що за умов експериментального хронічного коліту, спостерігається значний лейкоцитоз: загальний вміст лейкоцитів крові статистично значимо збільшувався на 62,6 %, вміст гранулоцитів - на 33,3 %. у порівнянні з визначеними показниками у інтактних тварин. За умов виникнення експериментального хронічного коліту може виникати мобілізація захисних сил організму, зокрема за рахунок резервів нейтрофілів.

У щурів з модельованим хронічним колітом вміст лімфоцитів значно підвищувався, а саме на 58,1 %. Найбільш значних змін зазнавали макрофаги – моноцити крові, їхній вміст збільшувався в 3,16 разів у порівнянні з відповідним показником у здорових щурів. Після проведеної корекції патологічного стану з застосуванням перорального введення наночастинок діоксиду церію ми спостерігали нормалізацію вмісту лейкоцитів в крові щурів: рівень значно зменшувався, а саме в 1,66 разів у порівнянні з показником у щурів з

експериментальним хронічним колітом до корекції наночастинками й практично не відрізнявся від рівня в крові інтактних тварин.

Після корекції діоксидом церію експериментально викликаного патологічного стану з боку товстої кишки: лімфоцити значно знижувалися, а саме в 1,98 разів у порівнянні з цим показником у щурів з хронічним колітом до лікування та спостерігалася тенденція до зниження нижче отриманих даних у інтактних щурів. Моноцитоз, що спостерігався в організмі щурів з експериментальним хронічним колітом, після введення наночастинок діоксиду церію вміст макрофагів знижувався практично в 2 рази, однак залишався підвищеним - на 66,6 %, у порівнянні з вмістом макрофагів у крові щурів, що складала контрольну групу. Вміст гранулоцитів в крові щурів після корекції наночастинками не змінювався. У таблиці 3.2. наведені дані щодо вмісту еритроцитів, гемоглобіну та тромбоцитів в крові щурів.

Таблиця 3.2

Основні показники крові у щурів контрольної та експериментальних груп (Ме [25%;75%])

Групи	Медіана	25% персентиль	75% персентиль
Гемоглобін (g/l)			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	138,0	133,5	145,3
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	131,0 p=0.1087	127,5	137,3
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	131,5 p _{1,2} >0,05	128,0	135,3
Еритроцити (10 ¹² /l)			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	7,550	7,285	7,740
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	6,980** p=0.0087	6,760	7,238
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	6,860 p=0.0022, p ₁ >0,05	6,720	7,055
Гематокрит			
Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	0,4155	0,4050	0,4243
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	0,3715** p=0.0022	0,3590	0,3793
Після корекції наночастинками діоксиду церію (n=6)	0,3735 p=0.0022, p ₁ >0,05	0,3620	0,3793
Тромбоцити (10 ⁹ /l)			

Контрольна група (H ₂ O) (n=6)	257,0	247,8	267,3
Хронічний коліт (ДСН) (n=6)	944,5** p=0.0022	848,0	1067,0
Після корекції наночастинок діоксиду церію (n=6)	791,5 p=0.0275; p ₁ =0.0048	747,0	858,0

*Примітка:** - $p < 0,01$ - достовірність відмінностей по відношенню до відповідних показників у представників з контрольної групи; $p_1 < 0,01$ - достовірність відмінностей у порівнянні з показниками у щурів з експериментальним хронічним колітом.*

За умов розвитку експериментального хронічного коліту у щурів спостерігали зниження еритроцитів на 7,5 % у порівнянні з цим показником у контрольній групі на тлі тенденції до зниження гемоглобіну. Однак визначалося незначне зниження гематокриту за умов патологічного стану на 10,59 % у порівнянні з цим показником у інтактних щурів.

Найбільших змін зазнавали тромбоцити крові щурів за умов експериментального хронічного коліту, їхній вміст значно підвищувався та досягав $944,5 \times 10^9/l$, що в 3,67 разів було вище, у порівнянні зі зазначеним показником у крові інтактних тварин, що свідчить про залученість тромбоцитів в патологічний процес. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію ми спостерігали зниження вмісту тромбоцитів на 16,2 %, однак їхній вміст не досягав рівня у інтактних тварин та залишався підвищеним практично на 208 %. Стосовно проведеної корекції: введення наночастинок впливало на вміст гемоглобіну та еритроцитів, а також показник гематокриту. У щурів з хронічним колітом спостерігалось зниження гематокриту на 10,59 % , що свідчить про незначне зниження вмісту еритроцитів в крові щурів.

Таким чином, загальна кількість лейкоцитів та кількість кожної з популяцій лейкоцитів (гранулоцитів, моноцитів, лімфоцитів) у крові щурів експериментальної групи з хронічним колітом була вірогідно підвищеною, порівняно з контрольною групою. Так, загальна кількість лейкоцитів в крові тварин зростала на 62,6 % ($8,05 \times 10^9$ проти $4,95 \times 10^9$, $p=0,0022$), лімфоцитів - на 58,1 % ($5,85 \times 10^9$ проти $3,7 \times 10^9$, $p < 0,01$), гранулоцитів - на 33,3 % ($1,4 \times 10^9$ проти $1,05 \times 10^9$, $p=0,0046$), моноцитів на 216,7 % ($0,95 \times 10^9$ проти $0,3 \times 10^9$, $p < 0,01$) у

крові щурів з хронічним колітом порівняно з цими показниками у щурів контрольної групи.

Нейтрофіли є гранулоцитами та представляють найчисельнішу фракцію фагоцитуючих лейкоцитів, вони швидко проникають до запалених тканин і відіграють важливу роль у захисті організму від патогенної мікробіоти. Мають бактерицидну активність, що здійснюється за допомогою різноманітних спеціалізованих ефекторних механізмів: фагоцитоз, генерація активних форм кисню, дегрануляція та вивільнення секреторних везикул, що містять антимікробні фактори широкого спектру дії. Гомеостатична регенерація нейтрофілів в організмі відбувається шляхом апоптозу. Нещодавні наукові дослідження виявили біохімічні механізми, за допомогою яких нейтрофіли піддаються різним формам регульованої клітинної загибелі. Наразі відомі різні способи регульованої клітинної загибелі, що були описані в нейтрофілах: піроптозу нейтрофілів та його ролі в інфекціях і аутозапаленні [113].

АФК, що продукуються нейтрофілами, беруть участь не тільки у знешкодженні патогенів, але й у регуляції апоптозу нейтрофілів [114].

Генерація АФК запускається ензимом - оксидоредуктазою - НАДФН - оксидазою. Індукція збірки НАДФН-оксидази в плазматичній мембрані призводить до вивільнення супероксиду в позаклітинний компартмент або в попередньо сформовану фагосому. Навпаки, індукція збірки НАДФН - оксидази у внутрішньоклітинній мембрані (ймовірно, мембрані гранул) призводить до внутрішньоклітинного утворення супероксиду [115]. Внутрішньоклітинна генерація АФК прискорює апоптоз нейтрофілів [114].

3.2. Стан оксидантно - антиоксидантної системи в організмі щурів контрольної та експериментальних груп

В етіопатогенезі хронічного коліту значну роль відіграє надмірне утворення АФК, що сприяє зміні регуляції передачі різних сигналів, викликає запальну реакцію та пошкодження ДНК [112]. Визначені порушення сприяють

прогресуванню та погіршенню перебігу захворювання [116]. Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) – процес, що сприяє порушенню цілісності та в подальшому призводить до дисфункції клітин. Для оцінки протікання ПОЛ використовують визначення в біоматеріалі кінцевих продуктів: ТБК - активних продуктів, дієнових кон'югатів, 4-гідроксинеалу. На сьогоднішній час найбільш значимим біохімічним маркером ліпідної пероксидації та раннього оксидативного стресу є 8-ізопростан. Це простагландиноподібна речовина класу ізопростанів F₂, утворюється за умов окиснення поліненасиченої арахідонової кислоти. 8-Ізопростан синтезується поза циклооксигеназного шляху (генерує ПРГ). Тому синтез цього біохімічного маркеру в організмі вказує на підвищену ліпідну пероксидацію, розвиток оксидативного стресу за умов дисбалансу функціонування оксидантно - антиоксидантної системи та сприяє зниженню життєздатності клітин.

На сьогоднішній час відомо, що до АФК належать: супероксид (O₂), оксид нітрогену (NO), гідроксильний радикал (-OH), гідропероксильний радикал, пероксид водню (H₂O₂) і синглетний кисень [117].

Також АФК можуть утворюватися за умов дії позаклітинних та внутрішньоклітинних ефектів прозапальних цитокінів та інших медіаторів запалення. Це високоактивні біомолекули, що утворюються як побічні продукти клітинного метаболізму та аеробного дихання. Вони суттєво впливають на фізіологічні та біохімічні функції: диференціацію клітин, клітинну сигналізацію, життєздатність клітин та утворення прозапальних факторів [118]. За даними деяких авторів, АФК сприяють окисненню протеїнів, ліпідів, ДНК та інших макромолекул, що може призвести до біохімічних змін в організмі та сприяти шкідливим наслідкам [119].

Таким чином, АФК можуть посилювати ПОЛ. Мембранні ліпіди (фосфоліпіди) та ліпопротеїни, що містять значну кількість поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), значно вразливі до процесів вільно-радикального окиснення. Гідропероксидна група може приєднуватися до гідрофобних хвостів ненасичених жирних кислот під час ПОЛ. За умов порушень гідрофобних

взаємодій ліпід-ліпід та ліпідно-протеїнових взаємодій, відбуваються структурні зміни у біологічних мембранах та ліпопротеїнах. Це може також сприяти утворенню реакційноздатних похідних альдегідів та гідропероксильних радикалів, за умов цього відбуваються вторинні зміни інших клітинних компонентів.

ТБК- активні продукти та інші продукти ПОЛ можуть вступати в реакцію з аміногрупами амінокислоти лізину, імідазольними групами гістидину або сульфгідрильними групами цистеїну та пошкоджувати структуру протеїнів [120].

З даних наукової літератури відомо, що саме 8-ізопростан характеризується специфічністю, стабільністю у біологічному матеріалі, незалежністю від надлишкового надходження ліпідів з їжею. Особливо важливе те, що підвищення цього біохімічного маркера ліпідної пероксидації в крові може бути протягом декількох годин після дії тригера запалення [122].

У ході проведених досліджень було визначено вміст 8-ізопростану в крові щурів як основного біохімічного маркера ліпідної пероксидації та розвитку раннього оксидативного стресу в організмі щурів, що відображено в таблиці 3.3 та рисунку 3.1.

Таблиця 3.3.

Вміст 8-ізопростану (пг/мл) в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом, (Me [25% перцентиль; 75% перцентиль])

Групи тварин	Медіана [25% перцентиль; 75% перцентиль]
Контрольна група щурів (вживали питну воду), (n=6)	23,63 [19,28; 26,47]
Експериментальна група щурів з хронічним колітом, (n=6)	39,84 [33,77; 41,23]* p=0,01
Експериментальна група щурів з хронічним колітом після корекції, діоксид церію (n=6)	31,93 [25,81; 38,07] p=0,0260, p ₁ >0,05

Примітка: $p < 0,05$ достовірність відмінностей у порівнянні з показником у інтактних тварин; $p_1 > 0,05$ – у порівнянні з показником у щурів з хронічним колітом.

Аналіз сироваткового рівня 8-ізопростану показав, що у експериментальних тварин, яким моделювали хронічний коліт за допомогою декстран сульфат натрію, значно, а саме на 68,6 % підвищувався вміст 8-ізопростану в крові щурів у порівнянні з показником у інтактних тварин.

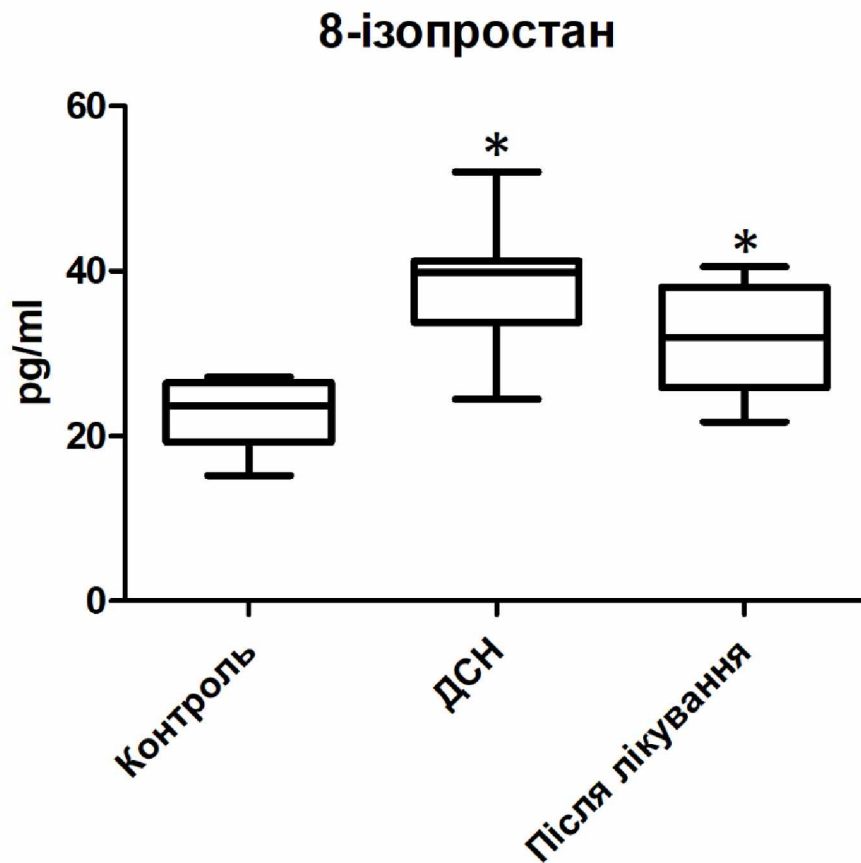


Рисунок 3.1. Вміст 8-ізопростану в сироватці крові щурів контрольної групи та експериментальних тварин з хронічним колітом з корекцією та без.

Примітка: * - достовірність відмінностей у порівнянні з показником у інтактних щурів.

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію вміст 8-ізопростану незначно знижувався, а саме на 24,7 % у порівнянні з цим показником до проведення корекції, однак не повертався до показника у інтактних тварин та залишався на 35,12 % вищим. Відомо, що цей біохімічний маркер ліпідної пероксидації в організмі утворюється внаслідок не ензиматичного вільнорадикального процесу перетворення поліненасиченої

арахідонової кислоти. Таким чином, у щурів з хронічним колітом спостерігається більш виразна активація ВРП та ліпідної пероксидації.

Після проведеної корекції діоксиду церію спостерігається незначне зниження ВРП та ліпідної пероксидації у порівнянні з щурами, яким не проводилася корекція наночастинками.

В організмі існує антиоксидантна система (АОС), що контролює біохімічні ефекти вільних радикалів. До компонентів АОС відносяться як ензиматичні, так й неензиматичні. Антиоксиданти відіграють важливу роль у пом'якшенні біологічного впливу АФК для підтримки окислювально-відновного балансу в організмі. Антиоксиданти захищають клітини від шкідливих і нестабільних молекул, усувають їх, запобігаючи, таким чином, окисленню ендогенних або екзодогенних молекул. До першої ланки АОЗ відносять ензими - антиоксиданти, до яких відносять супероксиддисмутазу (СОД), каталазу (КТ) і пероксидазу, зокрема глутатіонпероксидазу. Існують ще неферментативні антиоксиданти: токоферол, глутатіон, аскорбінова кислота, ретинол, каротиноїди, поліфеноли, урати тощо [122]. У групі природних антиоксидантів, глутатіон у своїй відновленій формі (GSH) усуває проміжні продукти реакції кисню та вільних радикалів, що утворюються під час метаболічних процесів [123]. GSH служить як субстрат для антиоксидантного ферменту глутатіонпероксидази (GPx) і допомагає виводити реактивні речовини.

За даними авторів, вміст вищезазначених біохімічних маркерів підвищені в біологічному матеріалі пацієнтів із ЗЗК, а їхні рівні корелюють з тяжкістю захворювання. Тому, на думку авторів, визначення вмісту маркерів оксидативного стресу в крові та калі можуть бути використані не тільки з метою ранньої діагностики ХЗЗК, але й у моніторингу відповіді організму на лікування, зокрема шляхом застосування антиоксидантів: вітаміну С, вітаміну Е, глутатіону та N-ацетилцистеїну [114].

На сьогодні в науковій літературі наявна інформація щодо ефективності потенційної терапії стовбуровими клітинами [124] та трансплантації фекальної мікробіоти [125].

Однак слід зазначити, що більшість наукових досліджень, що вивчали взаємозв'язок між тяжкістю ЗЗК та розвитком оксидативного стресу, не змогли виявити достовірної кореляції між ними [126]. Зазвичай окисно-відновний гомеостаз при хронічних запальних захворюваннях товстої кишки оцінювали опосередковано, автори досліджували окремі компоненти антиоксидантної системи або продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), зокрема дієнові кон'югати, малоновий діальдегід (ТБК-активні продукти) [127].

СОД - це антиоксидантний ензим, відповідальний за перетворення високоактивного супероксидного аніону (O_2^-) у менш реакційноздатні молекули, зокрема O_2 і H_2O_2 [128, 129]. Аналогічно, каталаза (САТ) і глутатіонпероксидаза (GPx) сприяють перетворенню H_2O_2 у воду [130].

Більше того, визнано, що кілька генів антиоксидантів мають генетичні варіації, що може призводити до відмінностей в активності та реактивності ферментів [131]. Певні генетичні варіації генів антиоксидантних ензимів можуть бути пов'язані з певними захворюваннями, генетичними профілями, пов'язаними з вразливістю до оксидативного стресу [132].

У сучасній науковій літературі існує інформація, що вміст продуктів ПОЛ пов'язана з експресією епітеліальної САТ та нейтрофільної мієлопероксидази (МРО), активністю нейтрофілів при НВК, що свідчить про H_2O_2 та/або ОСІ-опосередкований механізм. При НВК ПОЛ асоціюється з активністю мітохондріальної супероксиддисмутази, що дозволяє припустити залучення OH^- та O_2^- [133]. Це також підтверджується тим, що активність СОД підвищується під час активної фази захворювання і повертається до норми в період ремісії [134]. Крім того, наявність окислювального пошкодження та інгібування каталази, антиоксидантного ензиму, в імунних клітинах хворих на ХК ще більше підкреслює роль оксидативного стресу в патогенезі захворювання [135]. Ці результати вказують на можливе залучення ПОЛ та зміни активності СОД до біохімічних механізмів розвитку ЗЗК.

Отримані результати визначення активності СОД та САТ в крові щурів з контрольної групи та тварин з експериментальним хронічним колітом до та після корекції представлено в таблиці 3.4.

У крові експериментальних щурів з хронічним колітом наприкінці дослідження визначається значне підвищення активності антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутаза підвищується на 46,47 %, а каталаза – на 95,1 %, що свідчить про активацію ензиматичної ланки антиоксидантного захисту у порівнянні з результатами у щурів контрольної групи.

Таблиця 3.4

Активність антиоксидантних ферментів в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом до та після корекції, (Me [25% перцентиль; 75% перцентиль]).

Групи тварин	Супероксиддисмутаза, U/ml	Каталаза, U/ml
Контрольна група щурів (вживали питну воду), (n=6)	66,06 [64,62; 68,33]	0,369 [0,297; 0,444]
Експериментальна група щурів з хронічним колітом, (n=6)	96,76 [89,96; 103,40]* p=0,0022	0,720 [0,546; 0,944]* p=0,0043
Експериментальна група щурів з хронічним колітом після корекції, діоксид церію (n=6)	75,16 [71,79; 80,56]* p=0,0087, p ₁ =0,0022	0,590 [0,530; 0,866]* p=0,0043, p ₁ >0,05

Примітка: p<0,05 - достовірність відмінностей у порівнянні з показниками у інтактних тварин; p₁>0,05 – достовірність відмінностей у порівнянні з показниками у щурів з експериментальним хронічним колітом.

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію визначалося зниження як активності СОД, так й каталази, приблизно на 22,0 %, однак до значень активності як СОД, так і САТ у інтактних тварин не поверталися.

3.3. Генерація активних форм кисню в лейкоцитах периферичної крові щурів контрольної та експериментальних груп

Однією з функцій крові є її знешкоджуюча, бактерицидна дія. Це обумовлено тим, що кров містить клітини крові – фагоцити, нейтрофіли, що є мікрофагами, та моноцити-макрофаги, що здійснюють фагоцитоз.

Фагоцитарна активність цих клітин обумовлена здатністю лейкоцитів утворювати АФК, що в подальшому проявляється в здійсненні бактерицидної дії. Тому в нашій роботі було доцільним визначити АФК саме у лейкоцитах крові щурів з експериментальним хронічним колітом.

З даних сучасної наукової літератури відомо, що запальні захворювання кишечника (ЗЗК) - це хронічні імуніопосередковані захворювання, що вражають травну систему. Хвороба Крона (ХК) та неспецифічний виразковий коліт (НВК) є двома основними формами запальних захворювань ЗЗК. До кінця причини розвитку цих захворювань невідомі, скоріше за все, це пов'язано зі складною взаємодією різних індукуючих факторів: генетичних, екологічних та імунологічних [136]. Наразі постійно вивчаються та застосовуються нові методи лікування ХЗК, хоча ще й зараз не існує специфічних ліків від ЗЗК, однак розробляються кілька нових інноваційних ліків та підходів до лікування, включаючи таргетну терапію [137] та персоналізовану медицину [138].

Хоча етіопатогенез ЗЗК залишається практично невизначеним, однак вважається, що основним ланцюгом розвитку даного патологічного стану є дисфункціональна імунорегуляція кишечника. На сьогоднішній час серед імунорегуляторних факторів визначаються АФК та активні форми нітрогену (АФН), що є основними компонентами оксидативного стресу та за умов хронічного запального процесу у кишечнику синтезуються у високих кількостях. Тому роль оксидативного стресу у розвитку ЗЗК вважається одним з основних біохімічних механізмів [114, 139].

Руйнівний вплив активних форм кисню та нітрогену може викликати та поширювати розвиток патологічного процесу, сприяти виникненню ускладнень, оскільки ці агенти пошкоджують слизову оболонку кишківника та сприяють активації запальних сигнальних шляхів, що, в свою чергу, посилює запальний процес, викликаючи «порочне коло». Специфічні біохімічні маркери оксидативного стресу, такі продукти ПОЛ як ТБК - активні продукти, дієнові кон'югати, 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозин (8- OHdG) та вільні тіоли (R-SH) в

сироватці крові, можна визначити в значній кількості в крові та калі пацієнтів із ЗЗК, що підтверджує залучення в патогенез ВРП.

Наразі наукових досліджень, присвячених прямому визначенню АФК при хронічному коліті, дуже мало, й всі вони обмежуються вивченням впливу цього патологічного стану на локальну продукцію АФК у товстій кишці [127, 140, 141]. Декілька наукових досліджень визначили різні джерела АФК за умов ЗЗК, включаючи нейтрофіли, моноцити - макрофаги та запалену кишкову тканину [142]. Біохімічні механізми розвитку оксидативного стресу, за даними науковців, включають: підвищену генерацію АФК, порушення антиоксидантного захисту завдяки зниженню активності антиоксидантних ензимів або недостатність в організмі вітамінів з антиоксидантними властивостями, глутатіону, завдяки чого відбувається пошкодження важливих біомолекул. За умов оксидативного стресу може виникати мітохондріальна дисфункція та пошкоджуватися епітеліальні клітини товстої кишки з активацією запальних шляхів [143,144, 145]. Тому перспектива вивчення біохімічних механізмів розвитку оксидативного стресу при ЗЗК означає, що антиоксидантна терапія може бути потенційною стратегією для лікування хронічного коліту, зокрема перспективним є застосування інноваційних методик - нанотехнологій.

Таким чином, остаточні біохімічні механізми розвитку ЗЗК залишаються нез'ясованими. В існуючій науковій літературі зазначено, що численні фактори сприяють його етіопатогенезу, включаючи надмірну генерацію АФК, з подальшим пошкодженням біомолекул, розвиток мітохондріальної дисфункції, залучення імунних клітин, представлених макро- та мікрофагами периферичної крові, порушення системи антиоксидантного захисту та активація запальних шляхів.

Відомо, що при гострому або хронічному запальному процесі основним джерелом АФК у тканинах є клітини з фагоцитарною активністю: нейтрофіли та моноцити, що залучаються з кровотоку та потрапляють до запаленої тканини, а саме у місце ураження – товсту кишку. В сучасній науковій літературі існують дослідження, що присвячені генерації АФК в моноцитах і поліморфноядерних

лейкоцитах (ПМЯ) крові у хворих на ХК [146]. У цьому дослідженні було показано, що лейкоцити в процесі фагоцитозу в крові пацієнтів з ХК, після індукції різними прозапальними стимулами здатні регенерувати вищі рівні АФК порівняно з тими, що були отримані від здорових добровольців. Роботи, присвячені вивченню редокс-стану фагоцитуючих лейкоцитів крові при ЗЗК, зокрема при хронічному коліті, без їх попередньої індукції, відсутні. Вищезазначене надає актуальність нашому дослідженню.

На сьогоднішній час існує достатня кількість наукових доказів, що були отримані як з клінічних досліджень, так й за умов експериментальних моделей хронічного коліту на тваринах, що вказує на те, що оксидативний стрес сприяє розвитку ЗЗК через різні функціональні шляхи. Оксидативний стрес в організмі виникає тоді, коли продукція оксидантів перевищує антиоксидантний захист організму, що призводить до потенційного пошкодження біологічних систем [147]. Оксидативний стрес зазвичай розглядається як шкідливий для організму, оскільки пошкоджуються клітинні мембрани, органели, ДНК та протеїни. Однак певний низький рівень оксидативного стресу має вирішальне значення для багатьох фізіологічних процесів, таких як клітинна сигналізація та імунна відповідь. За умов оксидативного стресу може пошкоджуватися структура РНК, що бере участь у транскрипції та трансляції протеїнів у бактерій, що є необхідним для їхнього виживання [148]. Генерація АФК може сприяти апоптозу ракових клітин завдяки пошкодженню важливих клітинних компонентів: ДНК, протеїнів та ліпідів [149]. Стимуляція неогенезу та проліферації ракових клітин може відбуватися на тлі низького рівню АФК. Високий рівень генерації АФК може індукувати загибель клітин, зокрема процеси апоптозу, некрозу, ериптозу [150].

Таким чином, оксидативний стрес в організмі може бути як згубним, так і корисним для організму шляхом знешкодження патогенів і ракових клітин, залежно від концентрації АФК і ситуації, в якій він проявляється.

Хронічне запалення кишечника, як відомо, спричиняється надмірною генерацією АФК та АФН, що, в свою чергу, викликає оксидативний та

нітрозативний стрес. Оксидативний стрес може викликати деградацію слизового шару шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та бактеріальну інвазію, що запускає імунну систему і призводить до виникнення ЗЗК [151]. Отримані дані свідчать, що оксидативний стрес є потенційним агентом у патогенезі ЗЗК.

Для вирішення завдання нашої роботи, а саме визначення генерації АФК лейкоцитами крові експериментальних тварин ми використовували метод проточної цитофлюорометрії з застосуванням проточного цитометру. Це дозволило нам визначити окисно-відновний стан клітин крові. У нормальній здоровій клітині під час проміжного етапу катаболізму спостерігаються вільнорадикальні процеси (ВРП). Поряд з цим можна зазначити й протікання інших процесів: анаболічних (пластичних) – синтез катехоламінів, ейкозаноїдів, проліферативних процесів, роботу дихального ланцюга, процеси диференціації клітин. Ці ключові метаболічні процеси реалізуються завдяки утворенню в невеликій кількості вільних радикалів, що впливають на генерацію АФК.

Дослідження генерації АФК лейкоцитів крові щурів з хронічним колітом дозволить виявити розвиток раннього оксидативного стресу, та його роль в утворенні клітин з порушеною структурою: ранньоапоптотичних, пізноапоптотичних та некротичних. А також виявити позитивні та негативні сторони впливу наночастинок діоксиду церію на організм експериментальних тварин.

На рисунку 3.2 представлено цистограму та гістограму інтенсивності генерації АФК в лейкоцитах щура №3, що є представником контрольної групи. Середня інтенсивність флюоресценції (СІФС) дихлорфлюоросцеїну (ДХФС) у даного щура склала 389 у.о. Отримані нами результати СІФС ДХФС у представника з контрольної групи практично співпадають з результатами досліджень, отриманими іншими авторами [152].

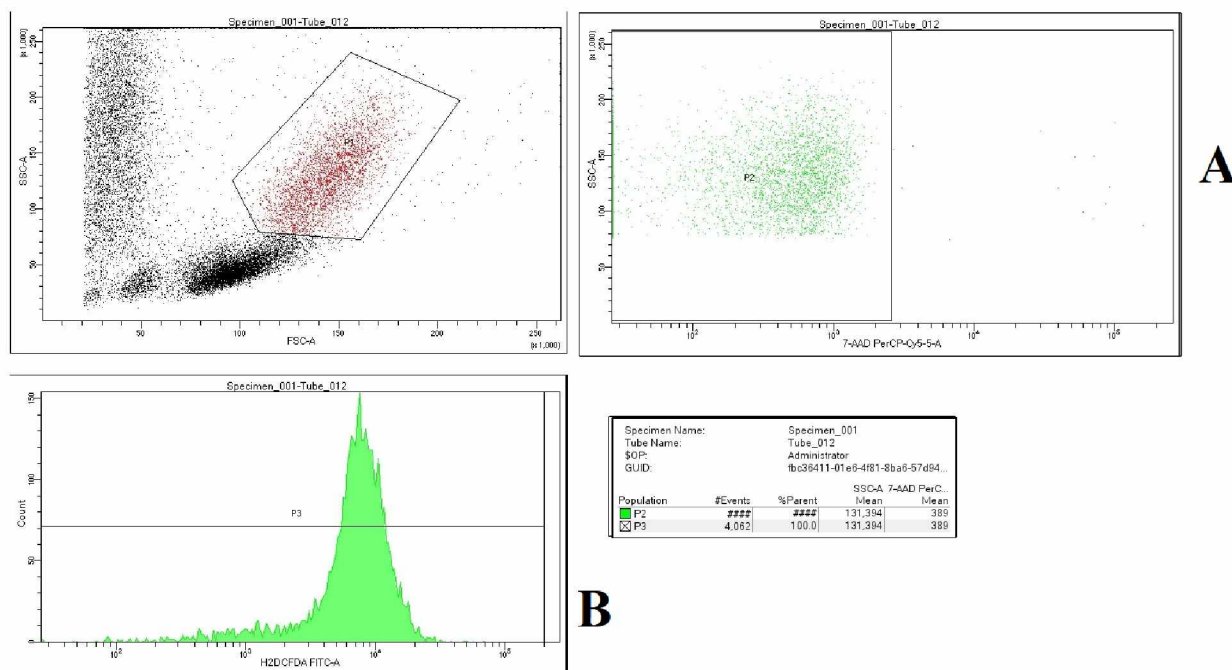


Рис. 3.2. Репрезентативні цитограма (A) та гістограма SSC/FL1 (ДХФС) (B) лейкоцитів щура №3 з групи інтактних щурів. Середня інтенсивність флюоресценції ДХФС склала 389 у.о.

Результати дослідження: цистограма, гістограма інтенсивності генерації активних форм кисню лейкоцитів крові щура № 6 з експериментальної групи, яким викликали хронічний коліт за умов введення ДСН, представлено на рисунку 3.3.

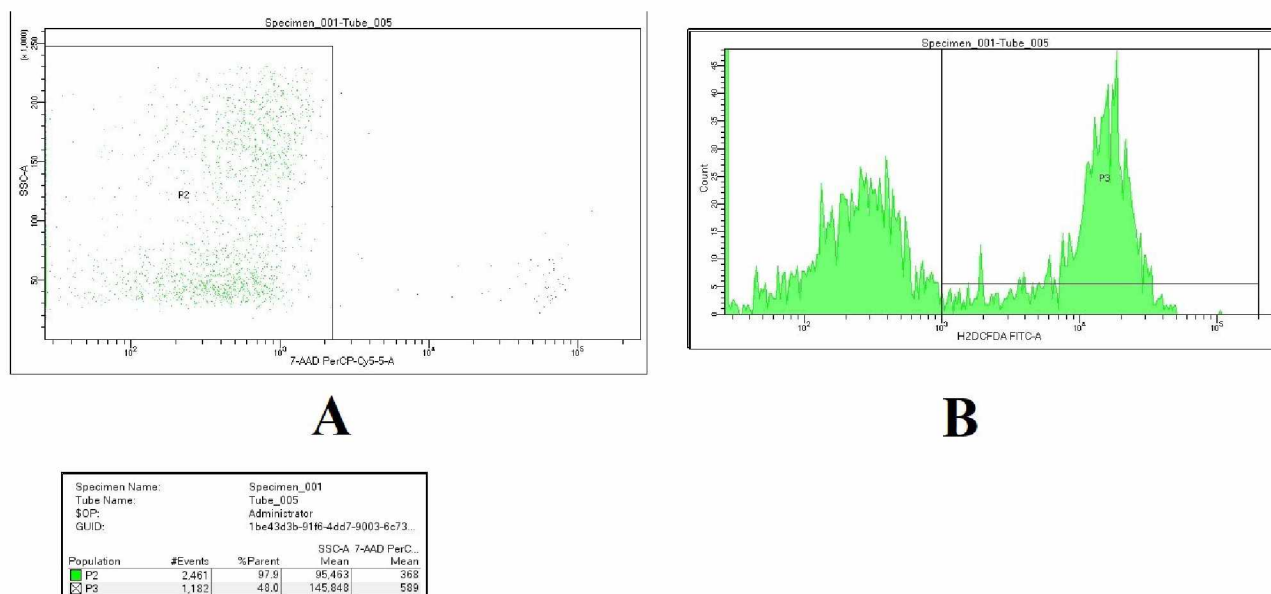


Рис. 3.3. Репрезентативні цитограма (А) та гістограма SSC/FL1 (ДХФС) (В) лейкоцитів щура №6 з експериментальної групи щурів з хронічним колітом. Середня інтенсивність флюоресценції ДХФС склала 589 у.о.

Після проведеної корекції патологічного стану діоксидом церію протягом 14 днів ми отримали результати генерації АФК лейкоцитами щура №1 з експериментальної групи 2, що представлено на рис.3.4.

Результати визначення інтенсивності процесів генерації активних форм кисню у лейкоцитах щурів контрольної та експериментальних груп представлено в таблиці 3.5. Нами було визначено: середню інтенсивність флюоресценції (СІФС) дихлорфлюоросцеїну (ДХФС) у життєздатних лейкоцитах крові експериментальних тварин.

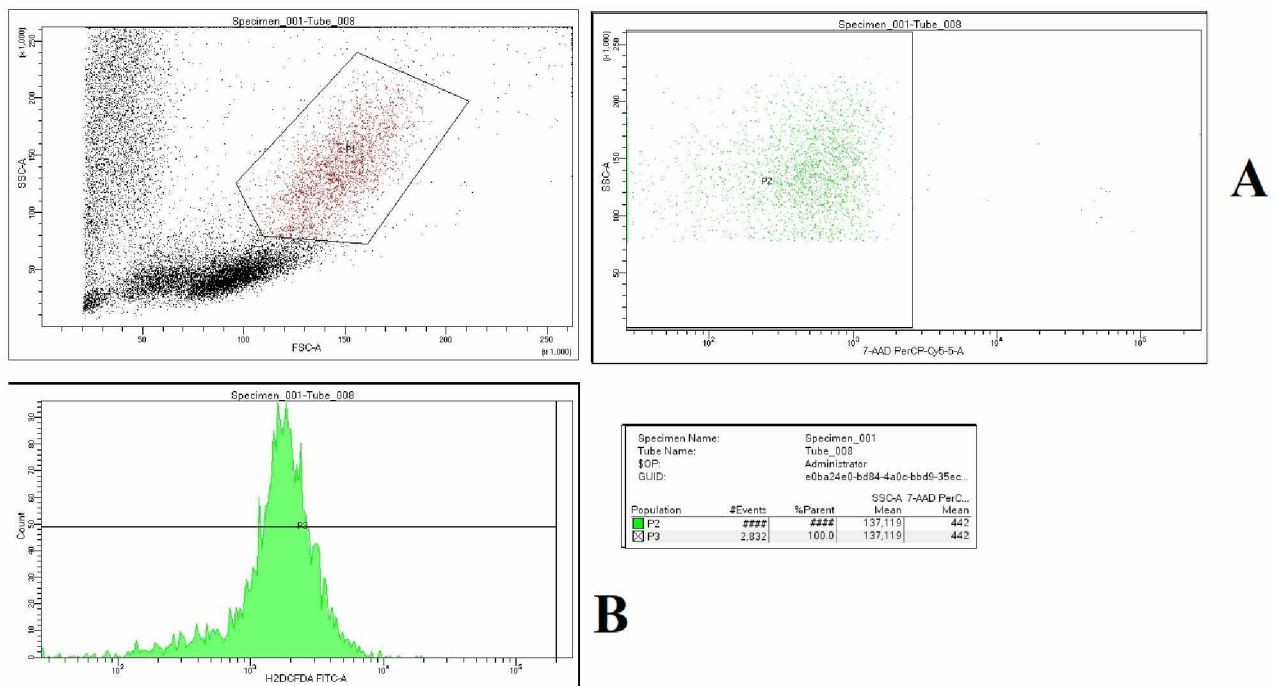


Рис. 3.4. Репрезентативні цитограма (А) та гістограма SSC/FL1 (ДХФС) (В) лейкоцитів щура №1 з експериментальної групи щурів з хронічним колітом після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію. Середня інтенсивність флюоресценції ДХФС склала 442 у.о.

У щурів контрольної групи СІФС ДХФС в лейкоцитах складає 401,0 [367; 427,8], отримані дані ми взяли як референтні. Аналіз флуоресценції ДХФС у CD45- позитивних, 7-AAD - негативних - клітинах (життєздатних лейкоцитах) виявив збільшення інтенсивності флуоресценції у щурів з експериментальним хронічним колітом на 38,5 % порівняно з показниками у контролю (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Середня інтенсивність флуоресценції дихлорфлуоросцеїну (у.о.) у життєздатних лейкоцитах (CD45⁺; 7-AAD⁻) крові інтактних та експериментальних тварин (Me [25% перцентиль; 75% перцентиль])

Групи	Медіана	25% перцентиль	75% перцентиль	Mean	SD
Контрольна група щурів, (n=6)	401,0	367,0	427,8	401,8	37,79
Експериментальна група щурів з хронічним колітом, (n=6)	555,5** p=0,049	492,3	589,0	544,3	47,98
Експериментальна група щурів з хронічним колітом після корекції, (n=6)	417,5 p>0,05; p ₁ =0,05	381,8	446,8	415,5	34,13

Примітка: p<0,01 – достовірність відмінностей у порівнянні з відповідним показником контрольної групи; p₁- достовірність відмінностей у порівнянні з показником у щурів з експериментальним хронічним колітом.

Це свідчить про статистично достовірно підвищений рівень генерації АФК у таких субпопуляціях лейкоцитів, як моноцити та гранулоцити, у щурів з DSS-індукованим хронічним колітом порівняно з контрольною групою.

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію СІФС ДХФС достовірно знижувалася на 33,05 % у порівнянні з показниками у щурів до корекції та практично не відрізнялася від показників у інтактних тварин.

Можна припустити, що інтенсивна продукція АФК лейкоцитами крові експериментальних тварин з хронічним колітом пов'язана з їх активацією в кровотоці за дією прозапальних цитокінів та/або запрограмованою зміною експресії, пов'язаних з апоптозом білків (рецепторів смерті, підвищення вмісту проапоптотичних або зниження антиапоптотичних білків) на етапах диференціювання та дозрівання. Це припущення підтверджується даними

наукової літератури. Так, за даними дослідження Avdagić N та ін. [153], у хворих на ХК та пацієнтів з ВК виявлено підвищений рівень прозапального цитокіна - ФНП порівняно зі здоровими особами. За даними інших джерел літератури, вплив ФНП на виживання нейтрофілів залежить від його концентрації: при низьких концентраціях він підвищує виживання нейтрофілів, при високих - посилює їх процеси клітинної загибелі, зокрема апоптоз [154].

Протилежні ефекти ФНП- α можуть бути зумовлені існуванням антиапоптотичного механізму: каспазозалежного обороту антиапоптотичного білка Bcl-1 у високих концентраціях та ФНП- α -опосередкованої активації експресії Bcl-1 у низьких концентраціях [155].

Крім того, субпопуляції нейтрофілів відрізняються чутливістю до однієї і тієї ж концентрації ФНП- α : одна з них швидко втрачає мембранний потенціал мітохондрій і залучається до апоптозу, інша має підвищений мембранний потенціал мітохондрій, що сприяє затримці апоптозу [155].

В оглядовій статті [146] зазначається, що зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій сприяє вивільненню проапоптотичних білків, таких як: цитохром С, другого мітохондріального активатора каспаз (Smac)/DIABLO (прямий IAP-зв'язуючий білок з низьким pI), апоптоз-індукуючого фактору (AIF) та ендонуклеази G. Про можливість зміни співвідношення між цими субпопуляціями нейтрофілів при хронічному коліті свідчать результати про значно підвищену хемілюмінесценцію, індуковану форбол-міристат-ацетатом, що генерується розведеною цільною кров'ю пацієнтів з ХК, порівняно зі здоровими людьми [156].

Таким чином, у щурів з хронічним колітом спостерігалася збільшення генерації АФК лейкоцитами, розвиток оксидативного стресу з подальшим впливом на структурно-функціональний стан клітин, зокрема імунних. Застосування для корекції патологічного стану наночастинок діоксиду церію знижувало генерацію АФК, інтенсивність вільно-радикальних процесів у лейкоцитах крові до нормальних значень.

3.4. Генерація активних форм кисню в лейкоцитарних гранулоцитах периферичної крові щурів контрольної та експериментальних груп

Також було доцільним у нашій роботі дослідити середню інтенсивність флуоресценції дихлорфлуоресцеїну в популяції життєздатних гранулоцитів, а саме що представлені нейтрофілами, еозинофілами та базофілами. Для проведення аналізу ми дослідили генерацію АФК в популяції життєздатних гранулоцитів крові інтактних тварин та щурів з експериментальних груп.

На рисунку 3.5 представлено репрезентативні цитограму та гістограму гранулоцитів крові щура №2 з контрольної групи.

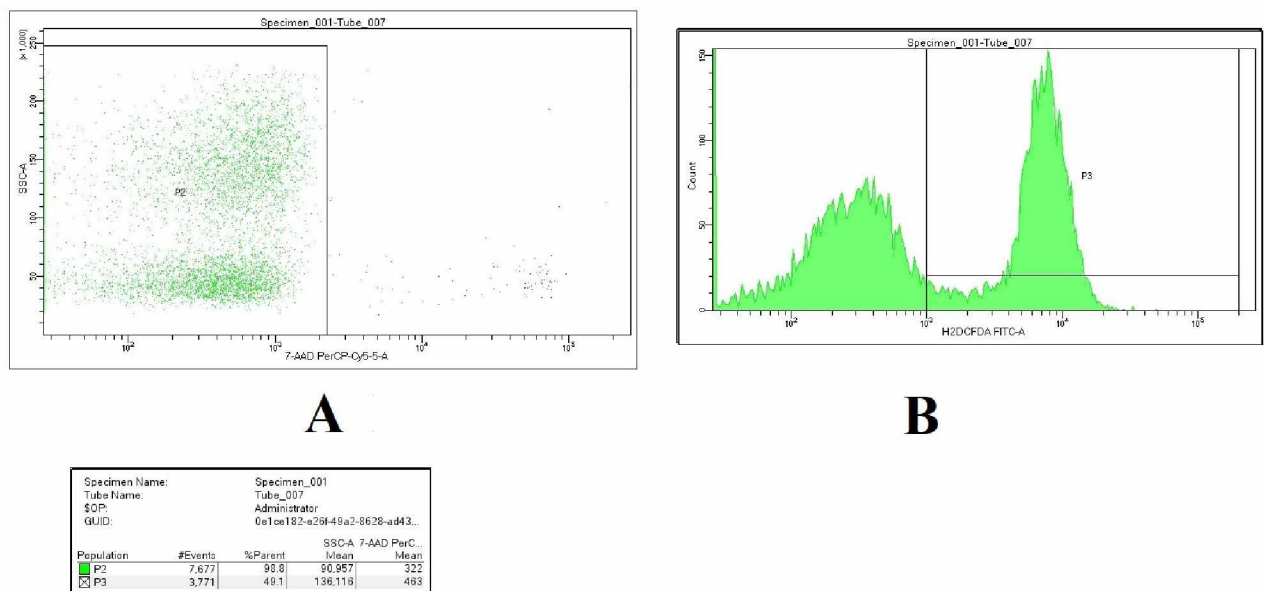


Рис. 3.5. Репрезентативні цитограма (А) та гістограма SSC/FL1 (ДХФС) (В) лейкоцитарних гранулоцитів щура №2 з групи інтактних щурів. Середня інтенсивність флуоресценції ДХФС склала 463 у.о.

На рисунку 3.6 представлено репрезентативні цитограму та гістограму гранулоцитів крові щура №4 з експериментальної групи з хронічним колітом.

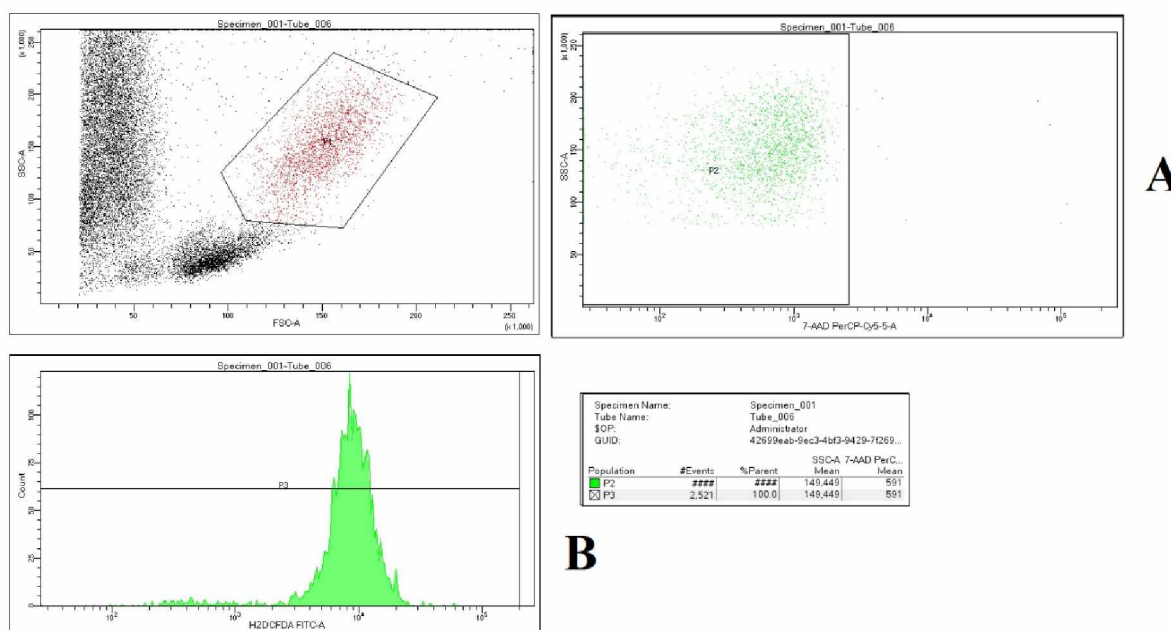


Рис. 3.6. Репрезентативні цитограма (А) та гістограма SSC/FL1 (ДХФС) (В) популяції життєздатних гранулоцитів крові щура №4 з експериментальним хронічним колітом. Середня інтенсивність флуоресценції ДХФС склала 591 у.о.

Репрезентативні цитограма та гістограма лейкоцитарних гранулоцитів щура № 3 з групи після корекції наночастинками діоксиду церію представлена на рисунку 3.7.

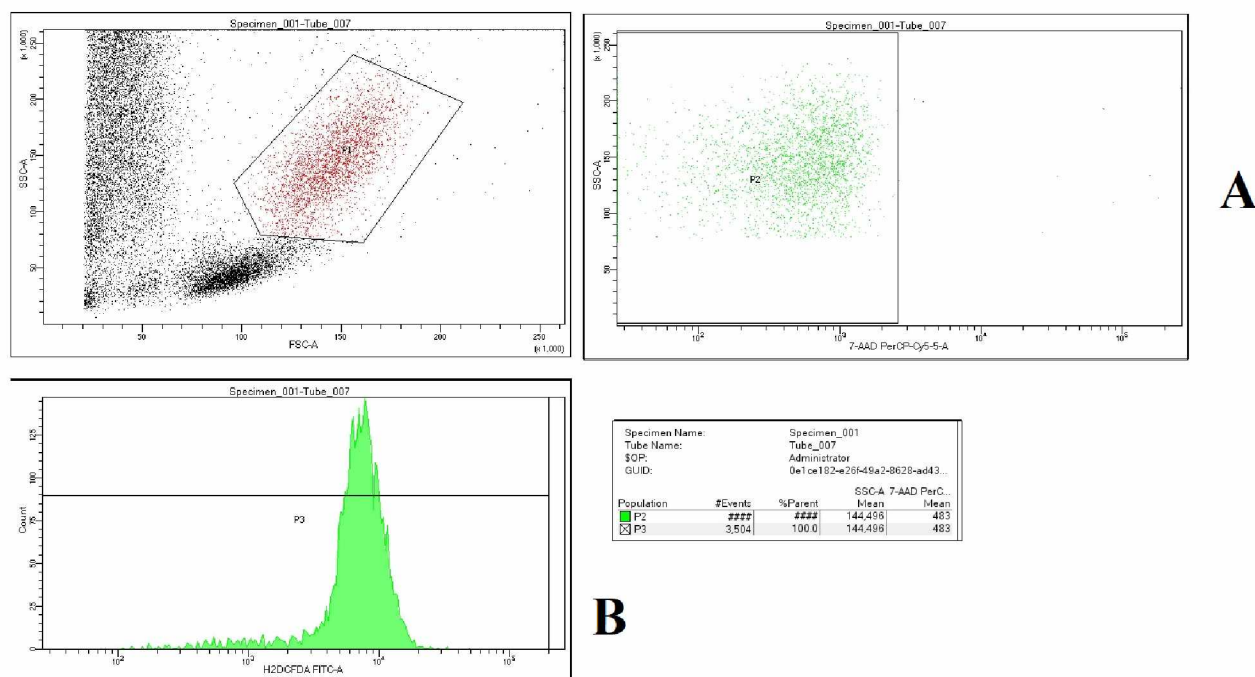


Рис. 3.7. Репрезентативні цитограма (А) та гістограма SSC/FL1 (ДХФС) (В) популяції життєздатних гранулоцитів крові щура №3 з хронічним колітом після корекції наночастинок діоксиду церію. Середня інтенсивність флюоресценції ДХФС склала 483 у.о.

Отримані результати було нами підсумовано та представлено в таблиці 3.6. При аналізі отриманих даних можна зазначити статистично значуще підвищення генерації активних форм кисню в гранулоцитах крові тварин з хронічним колітом – на 46,0 % у порівнянні з показниками у інтактних тварин. Після проведення корекції діоксидом церію визначалась тенденція до зниження генерації АФК на 13,2 % у порівнянні з показниками до корекції та отримані значення не повертались до референтних у інтактних тварин.

Таблиця 3.6

Генерація активних форм кисню (середня інтенсивність флюоресценції дихлорфлюоросцеїну) (у.о.) в популяції життєздатних гранулоцитів крові інтактних та експериментальних тварин (Me [25% перцентиль; 75% перцентиль]).

Групи	Медіана	25% перцентиль	75% перцентиль	Mean	SD
Контрольна група щурів (вживали питну воду), (n=6)	382,5	363,0	390,5	378,5	14,83
Експериментальна група щурів з хронічним колітом, (n=6)	558,5 p=0,022	482,5	597,5	543,8	65,35
Експериментальна група щурів з хронічним колітом після корекції, (n=6)	485,0 p=0,022 p ₁ =0,228 1	441,5	570,0	501,0	62,72

Примітка: $p < 0,01$ - достовірність відмінностей у порівнянні з відповідним показником контрольної групи; p_1 - у порівнянні з показником у щурів з експериментальним хронічним колітом.

Таким чином, у щурів з хронічним колітом інтенсивна генерація АФК спостерігається у всіх популяціях лейкоцитів на 38,5 %, в гранулоцитах – на 46,0 %. Найбільш значущий вплив наночастинок діоксиду церію спостерігався на

загальну популяцію лейкоцитів, та практично не впливали на зниження генерації АФК у гранулоцитах крові щурів. Наночастинки діоксиду церію найбільш впливали на вміст моноцитів в крові експериментальних тварин.

3.5. Дослідження життєздатності та видів клітинної смерті лейкоцитів крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом

За умов підвищеної генерації АФК лейкоцитів у щурів з хронічним колітом може виникнути зниження життєздатності лейкоцитів та їхня передчасна загибель за умов підвищення процесів апоптозу та некрозу. Основними видами загибелі лейкоцитів є апоптоз, піроптоз, ериптоптоз, некроптоз, аутофагія тощо. Дослідження життєздатності та видів клітинної загибелі клітин необхідно для розуміння імунної регуляції та підтримки гомеостазу при патологічних станах. Визначення цих процесів та їх розуміння дозволить діагностувати патологічні стани та розробляти методи їхньої корекції. За допомогою сучасного методу - проточної цитометрії можна оцінити життєздатність клітин та визначити види клітинної загибелі, зокрема апоптозу, некрозу в циркулюючих в крові лейкоцитів. Апоптоз - запрограмована загибель клітин, при який відбуваються структурні зміни з подальшим фагоцитозом для усунення пошкоджених клітин. Цитометрія дозволяє виявити наступні специфічні зміни та застосовувати в дослідженні як маркери апоптозу: зморщення клітин, конденсацію ядра та цитоплазми. Маркерами апоптозу клітин також може бути зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу з використанням катіонних ліпофільних зондів, останні здатні проникати в клітину та накопичуватися в мітохондріях.

Ми в своїх дослідженнях використовували найбільш специфічний маркер - екстерналізацію фосфатидилсерину (ФС) в цитоплазматичній мембрані. Цей мембранний фосфоліпід розташований у внутрішньому бішарі мембран життєздатних клітин. Транслокація фосфатидилсерину до зовнішнього шару мембрани є ознакою раннього апоптозу. Біологічне значення цього процесу:

сигнал для макрофагів для подальшої утилізації структурно змінених апоптотичних клітин. Покрокове характеризуємо методику: 1) перехід ФС на поверхню мембрани; 2) зв'язування з фарбником - аннексин V; 3) визначення інтенсивності флюоресценції, що дорівнює кількості ФС на зовнішньому шарі цитоплазматичної мембрани.

При пізньому апоптозі та некрозі може підвищуватися проникність мембрани клітин. Барвник 7-AAD може проникати через цитоплазматичну мембрану та визначатися всередині клітин. У своєму дослідженні використовували FITC – мічений аннексин V (Annexin V FITC), фікоеритрин-мічені мишині моноклональні антитіла до CD45 (CD45 PE) та 7-AAD. Некроз ідентифікували за порушенням цілісності мембрани за допомогою 7-аміноактиноміцину. Саме за допомогою аннексину – V ми можемо відокремити життєздатні клітини та визначити різні види клітинної загибелі.

На рисунку 3.8 представлено типову цитограму з візуалізацією життєздатних (97,8 %) лейкоцитів, ранньоапоптотичних (0,5 %), пізньоапоптотичних (0,8 %) та некротичних (0,9 %) клітин крові щура №4 з контрольної групи, що вживали питну воду.

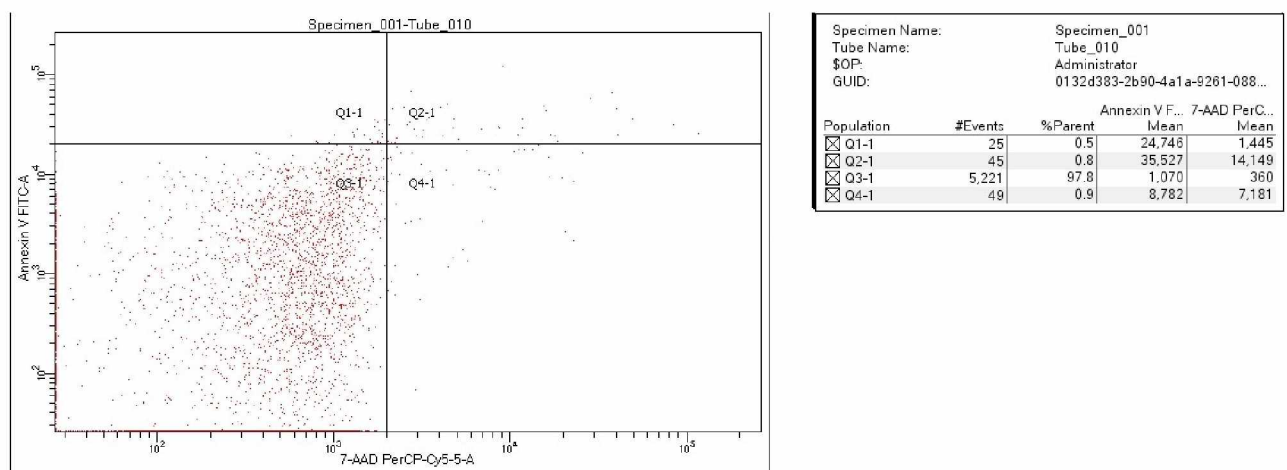


Рис. 3.8. Типова цитограма з візуалізацією життєздатних, ранньоапоптотичних, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів периферичної крові представника (щур № 4) з інтактних щурів.

У крові інтактних тварин (контрольна група) визначено значне превалювання відсотку життєздатних клітин над ранньо-, пізньоапоптотичними та некротичними клітинами.

На типовій цитограмі лейкоцитів крові щура №1 з хронічним колітом було визначено: 68,5 % життєздатних лейкоцитів, ранньоапоптотичних – 21,0 %, пізньоапоптотичних - 5,8 % та некротичних – 4,8 % (рис.3.9).

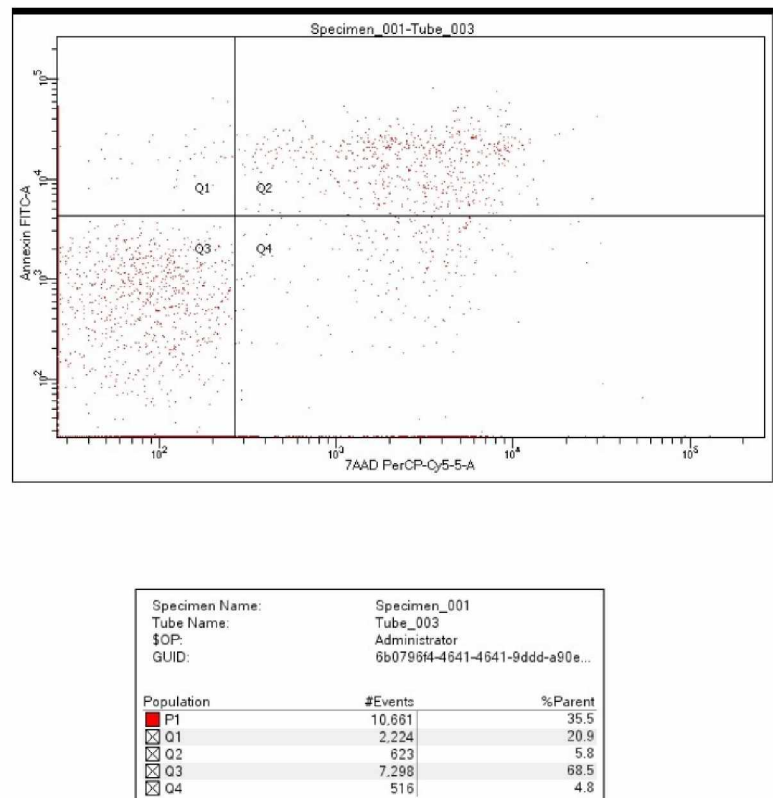
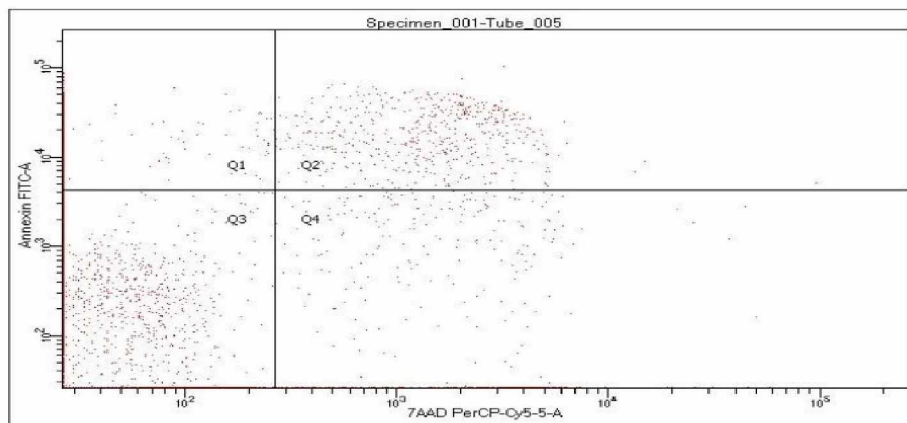


Рис. 3.9. Типова цитограма з візуалізацією життєздатних, ранньоапоптотичних, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів периферичної крові представника (щур № 1) з щурів з хронічним колітом.

На теперішній час відома роль апоптозу у функціонуванні імунної системи, цей процес запобігає розвитку аутоімунних розладів за допомогою інактивації пошкоджених лейкоцитів. Апоптоз може відбуватися двома шляхами: за внутрішнім (мітохондріальним), при цьому цей шлях запускається внутрішніми сигналами – розвиток оксидативного стресу та за зовнішнім, що запускається шляхом зв'язування лігандів із рецепторами на поверхні клітини.

Активується загибель клітин за допомогою активації ензимів каспаз, сімейства цистеїнових протеаз [157]. При некрозі відбувається денатурація внутрішньоклітинних протеїнів та перетравлення змертвілих клітин. Відбувається онкоз (збільшення об'єму клітин), набряк органел, розрив цитоплазматичної мембрани, вивільнення внутрішньоклітинного вмісту. Некроз не має регуляторних механізмів. Зараз відома інформація, що некроптоз, фероптоз – це процеси, що регулюються, генетично контролюються та мають значну роль в регуляції імунних реакції [158]. Типова цитограма з візуалізацією життєздатних, ранньоапоптотичних, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів периферичної крові щура №5 з хронічним колітом після корекції наночастинками діоксиду церію представлена на рисунку 3.10.



Specimen Name:	Specimen_001	
Tube Name:	Tube_005	
\$OP:	Administrator	
GUID:	f3540fa6-0f47-4143-acb4-73ece...	
Population	#Events	%Parent
■ P1	20,731	69.1
☒ Q1	2,503	12.1
☒ Q2	556	2.7
☒ Q3	17,192	82.9
☒ Q4	480	2.3

Рис. 3.10. Типова цитограма з візуалізацією життєздатних, ранньоапоптотичних, пізньоапоптотичних та некротичних лейкоцитів периферичної крові представника (щур № 5) з щурів з хронічним колітом після корекції.

При аналізі життєздатності та видів клітинної смерті лейкоцитів даного щура було визначено: 82,9% життєздатних клітин, 12,1 % - раноапоптотичних, 2,7 % - пізноапоптотичних та 2,3 % - некротичних клітин (рис.3.10).

Дослідження життєздатності та апоптозу лейкоцитів у крові піддослідних щурів показало достовірне зниження відсотка життєздатних клітин та збільшення апоптотичних клітин порівняно з інтактними тваринами (табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Аналіз життєздатності та видів клітинної смерті циркулюючих лейкоцитів крові інтактних тварин та експериментальних щурів з хронічним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію (Me[IQR])

Показники	Анексин V- негативні, 7AAD - негативні клітини, % (життєздатні, Q3)	Анексин V- позитивні, 7AAD- негативні клітини, % (ранньоапопт отичні, Q1)	Анексин V- позитивні, 7AAD- позитивні клітини, % (пізноапопто ичні, Q2)	Анексин V- негативні, 7AAD- позитивні клітини, % (некротичні, Q4)
Групи тварин				
Контрольна група щурів (вживали питну воду), (n=6)	97,60 [96,95; 98,30]	0,65 [0,40; 0,82]	0,95 [0,40; 1,30]	0,80 [0,80; 0,90]
Експериментальна група щурів з хронічним колітом, (n=6)	66,90 [65,25; 69,53], p = 0,0022	25,10 [21,43; 26,93], p = 0,0022	4,75 [3,15; 5,35], p = 0,0049	2,85 [2,55; 4,82], p = 0,0043
Експериментальна група щурів з хронічним колітом після корекції, (n=6)	83,40 [79,23; 86,58] p, p ₁ = 0,0022	12,90 [10,93; 15,20] p, p ₁ = 0,0022	2,40 [1,72; 3,87] p = 0,012 p ₁ = 0,09	1,25 [0,75; 2,15] p > 0,05 p ₁ = 0,026

Примітка: $p < 0,01$ - достовірність відмінностей у порівнянні з відповідним показником контрольної групи; p_1 - у порівнянні з показником у щурів з експериментальним хронічним колітом.

У відсотковому відношенні життєздатні клітини зменшилися в 1,46 рази ($p = 0,022$), а відсоток апоптотичних клітин збільшився (ранні апоптотичні клітини в 38,6 рази, $p < 0,005$; пізноапоптотичні клітини в 5 разів, $p < 0,001$; некротичні лейкоцити в 3,56 рази, $p < 0,01$) у крові щурів дослідної групи порівняно з контрольною групою. Це свідчить про більшу схильність до апоптозу та меншу стабільність лейкоцитів у щурів з хронічним колітом порівняно з контролем.

У нашому дослідженні визначали саме внутрішньоклітинні АФК. Ми виявили підвищений рівень АФК у лейкоцитах крові тварин дослідної групи порівняно з контролем. Причому підвищене утворення АФК супроводжувалося посиленням апоптозу та зниженням життєздатності циркулюючих в крові лейкоцитів.

Таким чином, у наших попередніх дослідженнях було визначено підвищену генерацію АФК в лейкоцитах крові та доведена роль основних фагоцитів – нейтрофілів та моноцитів в патогенезі хронічного коліту. При аналізі видів клітинної смерті лейкоцитів ми спиралися на те, що до 70 % лейкоцитів є нейтрофілами, що приймають безпосередню роль в імунній відповіді організму. Інтенсивна генерація АФК може призводити до порушень життєздатності лейкоцитів та сприяти їхньої загибелі. Отримані дані свідчать про посилення мієлопоезу та лімфопоезу у тварин з хронічним DSS-індукованим колітом. Однак співвідношення між окремими фракціями лейкоцитів практично не змінюється, за винятком моноцитів. У щурів із хронічним DSS-індукованим колітом спостерігається посилене утворення АФК та підвищений апоптоз лейкоцитів.

Отримані результати свідчать про посилення лейкопоезу з утворенням лейкоцитів, схильних до підвищеної генерації АФК і підвищеного апоптозу у щурів з DSS-індукованим хронічним колітом. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію спостерігалось значне підвищення відсотку життєздатних клітин в 1,25 рази, зниження відсотку ранньоапоптотичних та пізньоапоптотичних клітин в 1,95 та 1,98 разів відповідно та значне зниження відсотку некротичних клітин в 2,28 разів. Тільки відсоток некротичних клітин повертався до нормальних значень у інтактних тварин.

Таким чином, у щурів з експериментальним хронічним колітом спостерігалось значне зменшення відсотку життєздатних лейкоцитів на тлі збільшення відсотку лейкоцитів, що знаходяться на стадії раннього- та пізнього апоптозу та некрозу. У щурів після корекції наночастинками двооксиду церію спостерігався антиапоптотичний ефект.

3.6. Визначення в крові інтактних тварин та експериментальних тварин з хронічним колітом моноцитарно - хемокінового протеїну-1 (MCP-1) та серпіну A4

В останній час запальні захворювання кишечника (ЗЗК) розглядаються як аутоімунні захворювання, однак етіопатогенез цих хронічних захворювань кишечника залишається невизначеним [159]. На теперішній час вважається, що основними факторами розвитку ЗЗК є генетична схильність, вплив факторів навколишнього середовища, порушення імунної відповіді та дисбаланс мікробіому кишечника [39].

Визначені фактори можуть сприяти виникненню ЗЗК, що призводить до пошкодження слизової оболонки кишечника [5, 159].

До першої лінії захисту функціонування імунної системи відноситься муцинозний епітеліальний бар'єр слизової оболонки кишечника, що пошкоджується за умов хронічного коліту та підвищується її проникність для різних речовин [160]. Існує наукова інформація, що за умов втрати бар'єрної функції слизової оболонки кишечника покращується поглинання люмінальних антигенів. Однак наразі ще залишається невизначеним, чи така дисфункція передуює розвитку виразкового коліту, чи є наслідком хронічного запалення [35, 161]. Наразі існують декілька наукових робіт щодо вивчення ролі хемокінів в патогенезі хронічного коліту. Хемокіни (хемотаксичні цитокіни) - це сімейство цитокінів, невеликих гепаринзв'язуючих протеїнів молекулярною масою 7-15 кДа, що містять від 60 до 100 амінокислотних залишків. Основною функцією хемокінів є регуляція клітинного потоку, залучення у хемоатракцію клітин імунної системи, приймають участь у регуляції інтенсивності запалення шляхом залучення імунокомпетентних клітин до зони запалення. Ці протеїни виділяються у відповідь на такі сигнали, як дія прозапальних інтерлейкінів, де вони відіграють важливу роль у специфічному залученні популяцій лейкоцитів, зокрема моноцитів, нейтрофілів і лімфоцитів. Хемокіни можуть впливати на процеси диференціювання Т-хелперів, імунну відповідь організму.

Після індукції процесу визначається міграція клітин, що експресують відповідні рецептори хемокінів, за хемокіновим градієнтом. Ці клітини переміщуються до значних локальних концентрацій хемокінів.

Хемокіни поділяють на дві основні функціональні групи: запальні та гомеостатичні. Запальні хемокіни залучають популяції лейкоцитів при запаленні та пошкодженні тканин, тоді як гомеостатичні – переміщують лейкоцити до вторинних лімфатичних органів, тимусу, у кістковий мозок [162]. Наразі визначена роль хемокінів у процесах кровотворення, переміщенні лімфоцитів, ангиогенезі та розвитку злоякісних новоутворень.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) – цитокін, що відноситься до підсімейства C-C-хемокінів (β -хемокінів), і є одним із найважливіших факторів хемотаксису моноцитів у вогнищі запалення, активує хемоатракцію моноцитів-макрофагів [163]. На теперішній час практично не має достатньої кількості наукових експериментальних досліджень щодо ролі протеїну (MCP) в патогенезі ЗЗК. Існують поодинокі експериментальні дослідження, що за дії MCP полегшуються клінічні симптоми коліту та відбувається репарація пошкоджених тканин товстої кишки у мишей з колітом, спричиненим DSS, та пригнічується експресія запальних факторів [164]. Крім того існують сучасні данні, що цей протеїн може модулювати склад мікробіоти кишечника у мишей з DSS - індукованим колітом [72]. Регуляція досягається за рахунок зменшення чисельності ключових бактеріальних родів, що спричиняють загострення ЗЗК. Існують наукові роботи, де визначено, що MCP може полегшити перебіг коліту шляхом комплексного регулювання мікробіоти кишечника та впливати на інтенсивність запального процесу, що знижує ризик виникнення коліту або покращує перебіг патологічного процесу [165]. Також у науковій літературі існують дані, що моноцитарний хемоатрактантний протеїн-1 (MCP-1) є потужним запальним хемокіном, що регулює активацію та хемотаксичну міграцію клітин-мішеней і сприяє запальним змінам на різних рівнях: клітинному та тканинному рівнях [166].

Існують декілька наукових досліджень, де визнають ключову роль моноцитарного хемотаксичного протеїну типу 1 в індукції та прогресуванні фіброзу, основною функцією якого є залучення до патологічного процесу моноцитів - макрофагів та їх активація [167]. Багато генів, що кодують ці білки CCR, які містять приблизно 360 амінокислотних залишків, тісно зчеплені з хромосомами 3p21-22. Усі ідентифіковані хемокінові рецептори є GPCR, що належать до сімейства рецепторів родопсину або серпину. Як правило, ці рецептори мають: короткий позаклітинний N-кінець, сім гідрофобних трансмембранних доменів, кожен з яких з'єднаний трьома позаклітинними і трьома внутрішньоклітинними петлями, і C-кінцеву внутрішньоклітинну область [159, 167]. Більшість CCR, що зв'язують один або декілька MCP, є спільними для інших хемокінів. Останнім часом MCP-1 привертає увагу серед інших хемокінів завдяки своїм імуномодуючим функціям [168].

Відома наукова інформація, що MCP-1 синтезується різними типами клітин: фібробластами, астроцитами, моноцитами, гладком'язовими клітинами, ендотеліоцитами та мікрогліальними клітинами або конститутивно, або індуковано після стимуляції метаболітами оксидативного стресу, цитокінами, факторами росту тощо. За даними науковців MCP-1 регулює рух і проникнення моноцитів до зони запалення, Т-лімфоцитів пам'яті та природних кілерів через регуляцію систем Т-хелперів-1 (ТН-1) і ТН-2 [169]. Регулюючи транспорт та функціонування моноцитів, Т-хелперів, MCP-1 може змінювати стан та відповідь як вродженої, так і адаптивної імунної системи. Таким чином, хемокін MCP-1 сприяє транспорту популяцій лейкоцитів, впливає на процеси фіброзу, ремоделювання тканин та ангіогенез під час запального процесу.

MCP-1 зв'язується з C-C хемокіновим рецептором типу 2 (CCR2), який присутній в різних типах клітин, включаючи астроцити, мікроглію, стовбурові клітини нейронів і нейрони ЦНС, а експресія CCR2 стимулюється у відповідь на дію інших прозапальних цитокінів, зокрема інтерлейкінів – IL-1 β та інших [170]. Моноцити - макрофаги, дендритні клітини, Т-лімфоцити беруть участь у запальних процесах, які в основному активуються за рахунок хемокіну MCP-1.

У деяких клінічних дослідженнях було показано, що синтез простагландину E (ПРГЕ) та прозапальних цитокінів блокується антидепресивним ефектом інгібіторів ЦОГ-2. У роботах показано, що моноцитарні хемотаксичні білки MCP-1 індукують міграцію моноцитів/макрофагів *in vitro*, а MCP-1, також відомий як MCAF, хемоатрагує базофіли, тучні клітини. Природний MCP-1 може стимулювати значний хемотаксис *in vitro* Т-лімфоцитів периферичної крові людини.

Визначено, що MCP-індукована міграція клітин дозозалежна та спрямована, однак не хемокінетична. CD4⁺, так і CD8⁺ Т-лімфоцити можуть мігрувати у відповідь на дію хемокінів [171].

Також наявна інформація щодо ролі моноцитарного хемоатрактантного білку MCP-1, прототипу хемокінів, що продукується різними клітинами *in vitro* після стимуляції TNF- α , IL-1. MCP-1 може спрямовувати відповідь організму на розвиток патологічного процесу шляхом створення нових запальних каскадів *in vivo*. MCP-1 може залучати нейтрофіли до процесу через синтез лейкотрієну B4 (LTB4). LTB4 може індукувати утворення MCP-1, що дозволяє припустити, що запальний процес в кишечнику може посилюватися за рахунок перехресної взаємодії MCP-1 та LTB4 [172]. Регуляцію хемотаксису в імунній відповіді за допомогою шляхів сигнальної трансдукції та їхнє значення в організмі необхідно дослідити. Наразі ідентифіковано регулятори хемотаксису - Ca²⁺-незалежну фосфоліпазу (iPLA₂ β) та цитозольну фосфоліпазу (cPLA₂ α), що знаходяться в цитоплазмі нестимульованих моноцитів. Після стимуляції MCP-1 iPLA₂ β рекрутується до збагаченого мембраною псевдоподу, а cPLA₂ α рекрутується до ендоплазматичного ретикулуму. Показують, що iPLA₂ β і cPLA₂ α регулюють міграцію моноцитів з різних внутрішньоклітинних локалізацій, причому iPLA₂ β діє як критичний регулятор клітинного компасу, що визначають їх як потенційні мішені для протизапальних стратегій.

Транскрипція гена MCP-1 вимагає активації або зв'язування NF- κ B і AP-1, таким чином, активуючи наступні шляхи передачі сигналу. MCP-1 залучає мононуклеарні макрофаги та стимулює інтерстиціальні фібробласти, які

відкладають протеїни до позаклітинного матриксу, що призводить до розвитку фіброзу. MCP-1 підвищує регуляцію TGF- β та інгібіторів матриксних металоферментів, збільшує інфільтрацію лімфоцитів та взаємодію з фібробластами (TIMP1), що в кінцевому підсумку призводить до фіброзу стінки кишечника [173]. У нашому дослідженні ми викликали хронічний коліт у щурів за допомогою декстрансульфат натрію, вивчали його вплив на розвиток патологічного стану при ЗЗК та залучення до цього процесу моноцитарно-хемокінового протеїну - 1 та серпину A4.

Розвиток експериментального хронічного коліту у щурів супроводжуються статистично достовірним підвищенням вмісту в крові досліджуваного хемокіну – MCP-1.

Отримані результати свідчать про те, що у інтактних тварин вміст у сироватці крові MCP-1 становить 34,93 [34,40; 35,30] пг/мл, ці значення ми використовували як референтні. У крові щурів експериментальної групи з хронічним колітом вміст MCP-1 становить 44,64 [41,81; 46,45] пг/мл, що на 27,8 % достовірно ($p=0,0022$) вище, у порівнянні з показником в крові інтактних тварин (рис. 3.11).

Отримані результати можуть свідчити про залучення даного цитокіну в розвиток патологічного процесу в кишечнику, зокрема підтриманні інтенсивності перебігу запального процесу за допомогою рекрутування нових моноцитів з подальшим перетворенням у макрофаги.

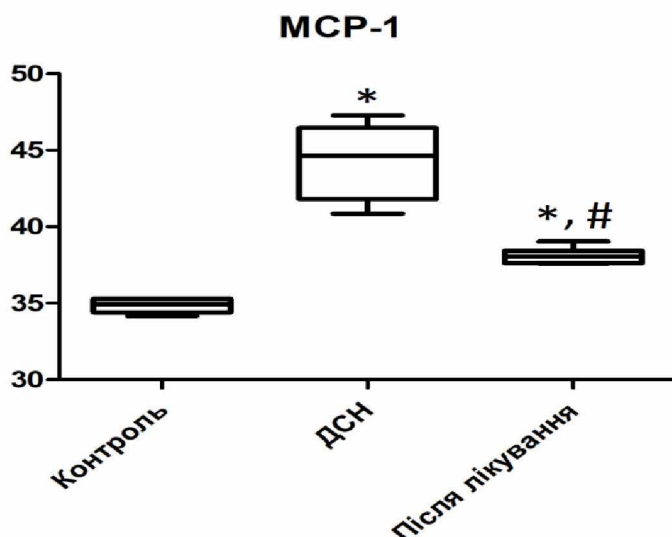


Рис. 3.11. Вміст моноцитарно-хемокінового протеїну-1 (pg/ml) в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію

Примітка: *- у порівнянні з показниками у контрольній групі;

- у порівнянні з показниками у щурів з хронічним колітом до корекції.

Таким чином, значне підвищення в крові MCP-1 у сироватці крові щурів демонструє, що цей протеїн є медіатором запалення та специфічно стимулює спрямовану міграцію Т-лімфоцитів, а також моноцитів до пошкодженої ДСН тканини кишки, й може відігравати важливу роль у залученні імунних клітин до місця запалення. Скоріше за все, MCP-1 спрямовує міграцію моноцитів крові до запалених тканин. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію спостерігається зниження вмісту в крові MCP-1 на 38,07 % у порівнянні з показником до корекції ($p=0,0022$), однак його вміст в крові не дорівнював нормальних значень, зазначалося його незначне підвищення (рис. 3.11). MCP-1 може активувати моноцитами пошкоджену кишкову тканину та індукувати секрецію різних цитокінів і фактора росту шляхом зв'язування з рецепторами CCR2, що сприяє проліферації епітеліальних клітин, ендотеліоцитів та гладком'язових клітин судин, що призводить до розвитку запального процесу.

Відомо, що серпіни - це найбільші кластери протеїнової природи, що інгібують серинові протеази [174]. У науковій літературі існують відомості, що

серпіни А4 є позаклітинним та регулюють активність протеаз за умов пошкодження та розвитку запального процесу [175].

Серпіни контролюють та регулюють фізіологічні процеси, їх дисфункція пов'язана з патогенезом різноманітних захворювань. У теперішній час визначають 9 груп серпінів (А-I). Біологічна роль одного з представників – серпіну А4 (каллістатину) – комплімент активації, стимулює ангиогенез, фібриноліз та апоптоз [176]. Деякі автори у своїх дослідженнях показали, що у шлунково-кишковому тракті людини міститься підвищена кількість серпінів, що синтезуються мікробіотою кишечника. Таким чином, підвищується інтерес дослідників до цих протеїнів як нових біохімічних маркерів запальних процесів кишечника.

У результаті проведеного дослідження було виявлено, що вміст серпіну А4 у сироватці крові інтактних тварин складав 11,99 [11,26; 12,51] нг/мл, у крові щурів з експериментальним хронічним колітом - 35,95 [27,89;38,34] нг/мл. Отримані результати свідчать про те, що при розвитку експериментального неспецифічного хронічного коліту у щурів значно підвищується в сироватці крові рівень серпіну А4: в середньому в 2,73 рази у порівнянні з цим показником у контрольній групі (рис. 3.12).

Виявлена нами гіперсерпінемія (підвищення рівня серпіну А4 в сироватці крові) у щурів, при формуванні експериментального хронічного коліту, може пояснювати розвиток запального процесу слизової оболонки товстої кишки. Але неможливо виключити факт, що підвищення рівня серпіну А4 в крові пов'язано не лише з розвитком запального процесу, викликаного введенням розчину ДСН, але й зі зміною мікробіоти кишечника, розвитком дисбактеріозу. Підвищений вміст в крові серпіну А4 може стимулювати фібриноліз, що сприяє кровотечі з пошкоджених тканин кишки та запрограмованої загибелі клітин - апоптозу. Гіперсерпінемія у щурів з експериментальним колітом може використовуватися в клінічній практиці як біохімічний маркер запального процесу кишечника, розвитку дисбактеріозу та фібринолізу.

Після проведення корекції патологічного стану наночастинками діоксиду церію вміст серпіну А4 у сироватці крові складав 14,10 [13,45; 14,44] нг/мл, знижувався в 2,55 разів у порівнянні з показниками крові щурів до корекції, але ще вміст серпіну не дорівнював показників у крові щурів контрольної групи, залишався збільшеним на 17,6 % (рис. 3.12).

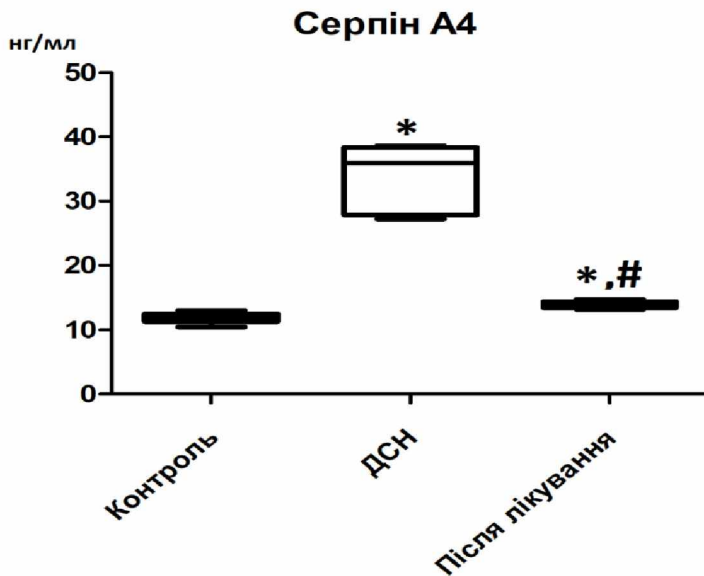


Рис. 3.12. Вміст серпіну А4 (нг/мл) в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію

Примітка: *- у порівнянні з показниками у контрольній групі;

- у порівнянні з показниками у щурів з хронічним колітом до корекції.

Таким чином, зниження вмісту в сироватці крові експериментальних тварин серпіну А4 після застосування наночастинок CeO_2 може знижувати фібриноліз, що буде сприяти зниженню кровотечі та інгібувати процеси апоптозу. Саме серпін А4 виступає в ролі антагоніста MCP-1 та впливає на баланс факторів, що регулюють процеси фібринолізу, апоптозу, некрозу та впливають на життєздатність клітин.

3.7. Визначення цитокінів: інтерлейкінів -1 β , -10 та TNF- α в крові інтактних тварин та щурів з експериментальним хронічним колітом

Згідно завдань нашого дослідження було доцільним визначити в крові експериментальних тварин вміст прозапальних цитокінів, зокрема IL-1 β та TNF- α . Відомо, що IL-1 β є багатофункціональним цитокіном: активує макрофаги, стимулює ангіогенез та регулює запалення, а саме стимулює [177]. Цей основний прозапальний цитокін синтезується переважно Т- та В - лімфоцитами, моноцитами, поліморфноядерними фагоцитами, фібробластами, ендотеліоцитами, дендритними клітинами тощо. Виступає важливим прозапальним цитокіном у великій кількості імунних сигналів, відіграє роль в опосередкуванні запального процесу, впливає на взаємодію вродженого та адаптивного імунітету. Інтерлейкін-1 β впливає на запальний процес: проліферацію, диференціацію клітин та запрограмовану клітинну загибель. Цей інтерлейкін синтезується у вигляді про- IL-1 β , який розщеплюється за умов дії каспази-1 та перетворюється в активну форму в інфламасомі – мультипротеїновому комплексі. Після активації спостерігається запальний процес, в печінці активується синтез білків «гострої фази», зокрема активно утворюється С-реактивний білок, відбувається міграція лейкоцитів до запальних тканин.

Визначена роль IL-1 β у здійсненні імунної відповіді організму, надмірний синтез прозапального інтерлейкіну сприяє розвитку аутоімунних та хронічних захворювань, зокрема кишечника. На теперішній час існують наукові дослідження щодо ролі цього цитокіну в хронізації процесу. Таким чином, цей прозапальний цитокін підтримує гомеостаз та регулює імунну відповідь. Визначений інтерлейкін індукує численні гени, включаючи молекули адгезії, протеази, цитокіни та хемокіни. Зв'язування IL-1 β з рецептором IL-1 (IL-1RI) активує шлях NF- κ B через активацію комплексу I κ B-кінази (IKK). Нещодавні наукові дослідження продемонстрували, що транскрипційний фактор NF- κ B відіграє ключову роль у запальних реакціях на різні стимули. Хоча встановлено,

що IL-1 β може індукувати експресію MCP1 через NF- κ B та активацію AP-1 в ендотеліоцитах, однак основні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи наразі недостатньо вивчені. Доказано, що IL-1 β індукує експресію MCP1 через активацію NF- κ B через сигнальний шлях PC-PLC/PKC [178]. Аналіз отриманих результатів представлено на рисунку 3.13. У щурів контрольної групи вміст IL-1 β в сироватці крові склав 3,207 [2,24;3,95] пг/мл, отриманні значення ми будемо використовувати для порівняння як референтні. В крові щурів з експериментальним хронічним колітом вміст прозапального інтерлейкіну дорівнював 7,77 [6,74;10,52] пг/мл, що на 142,3 % вище показників крові у інтактних тварин (рис. 3.13).

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію спостерігалось зниження вмісту в крові прозапального інтерлейкіну IL-1 β на 35,6 % у порівнянні з показниками до корекції, але ще відрізнявся від вмісту в крові у щурів контрольної групи – був вищим на 56,0 % .

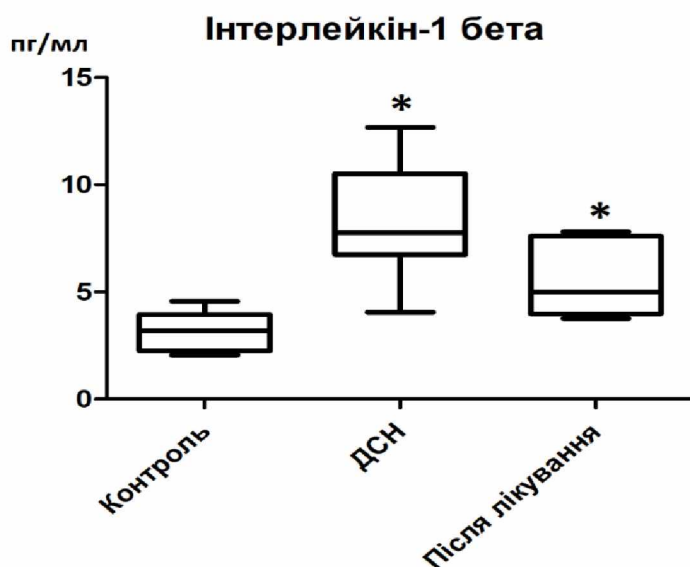


Рис. 3.13. Вміст інтерлейкіну-1 β (пг/мл) в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію

Примітка: *- у порівнянні з показниками у контрольній групі.

Дуже потужним протизапальним інтерлейкіном є IL-10, що пригнічує експресію численних прозапальних медіаторів, що, в свою чергу, зменшує

приплив макрофагів. Крім того, за дії IL-10 зменшується утворення надлишкової кількості фіброзної тканини у серці, легенях, печінці, нирках та інших тканинах. [179]. Інтерлейкін-10 синтезується антигенпрезентуючими клітинами, які можуть обмежувати секрецію прозапальних цитокінів, включаючи IL-1, інтерферон (ІФН)-гамма та фактор некрозу пухлин (ФНП)- α шляхом аутокринного зворотного зв'язку для посилення поглинання та фагоцитарної здатності, впливати на розвиток адаптивних реакцій [180]. Протизапальний інтерлейкін зв'язується з тетрамерним комплексом рецепторів IL-10 (IL10R), що складається з двох субодиниць IL10R- α і IL10R- β [181]. Фосфорилування IL10R індукує сигнальний трансдуктор і активатор транскрипції-3 (STAT3) через фосфорилування цитоплазматичних хвостів IL10R- α і - β Янус-кіназою-1 (JAK1) і тирозинкіназою-2 (Тук-2) відповідно [182]. IL-10 також пригнічує активність ядерного фактора каппа-легкий ланцюг- підсилювача активності активованих В-клітин (NF- κ B) для просування сигнального шляху STAT3-JAK.

Вміст в крові інтактних тварин протизапального інтерлейкіну IL-10 складав 7,93 [5,418; 8,48] пг/мл, що й ми використовували як референтні. У крові щурів з хронічним колітом вміст IL-10 складав 17,59 [16,63; 18,61] пг/мл, що в 2,22 рази перевищує відповідні показники у інтактних тварин (рис. 3.14).

Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію вміст інтерлейкіну залишався на тому ж рівні, незначно збільшувався на 6,9 % та в 2,37 разів перевищував показник у інтактних тварин.

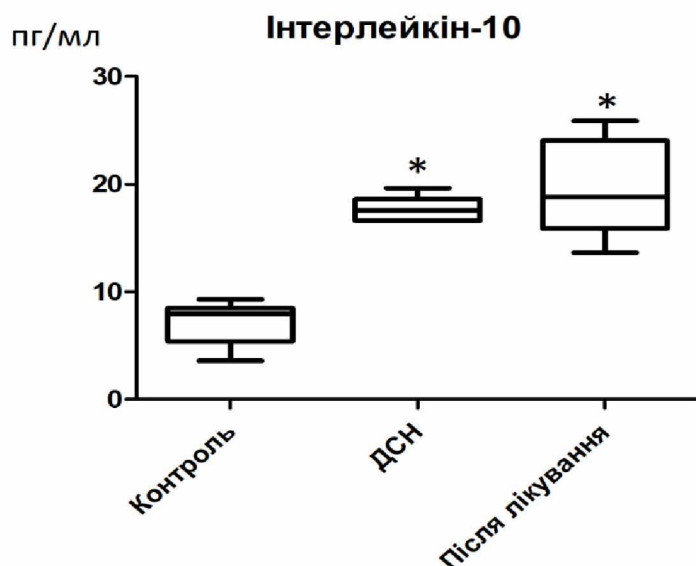


Рисунок 3.14. Вміст інтерлейкіну-10 (пг/мл) в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію

Примітка: *- у порівнянні з показниками у контрольній групі;

- у порівнянні з показниками у щурів з хронічним колітом до корекції.

Відомо, що TNF- α синтезується імунокомпетентними клітинами, комплексно регулює запальні та імунні процеси в організмі. Місцева запальна реакція на початковому етапі зв'язана зі секрецією тканинними макрофагами прозапального цитокіну - TNF- α . Цей інтерлейкін по-різному впливає на імунну систему організму. Запальна реакція та імунна відповідь, медіатор якої є TNF- α , відносяться до активації захисних сил організму. Вмзначення вмісту в крові експериментальних тварин прозапального цитокіну - TNF- α представлено на рисунку 3.15. У крові щурів контрольної групи вміст цього цитокіну складало 12,96 [11,15; 17,04] пг/мл, у експериментальних тварин з хронічним колітом – 24,74 [20,21; 33,57] пг/мл, що на 90,9 % вище ніж відповідні показники у інтактних тварин. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію вміст TNF- α знижувався та складав 17,07 [13,18; 19,98] пг/мл, що на 44,93 % знижувався у порівнянні з показником до лікування та залишався на 31,7 % вище показників у інтактних тварин (рисунок 3.15).

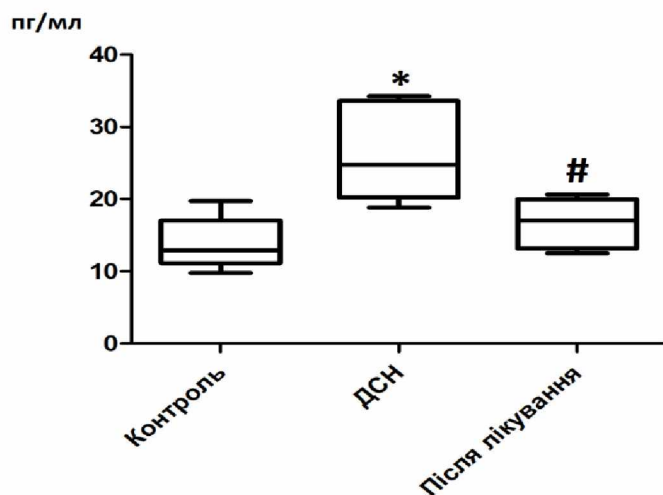


Рис. 3.15. Вміст $TNF-\alpha$ (пг/мл) в крові інтактних тварин та щурів з хронічним колітом до та після корекції наночастинками діоксиду церію

Примітка: *- у порівнянні з показниками у контрольній групі;

- у порівнянні з показниками у щурів з хронічним колітом до корекції.

Деякими авторами визначено, що синтез $TNF-\alpha$ викликає в організмі розвиток важкого патологічного процесу. Цей цитокін є не тільки потужним медіатором гострої фази запалення. Можна визначити, що високий рівень в крові $TNF-\alpha$ пов'язаний з тим, що виникає у первинному вогнищі запального процесу – синтез прозапального цитокіну тканиновими макрофагами за рахунок збільшення об'єму запальної реакції. Таким чином, визначення в крові щурів з хронічним колітом вмісту прозапального $TNF-\alpha$ є інформаційним біохімічним показником для ранньої діагностики патологічного процесу, що прогностично корелює з перебігом захворювання.

Для визначення значущості впливу прозапальних цитокінів ми визначали K_1 , що відображує співвідношення вмісту прозапального цитокіну $IL-1\beta$ до протизапального інтерлейкіну-10. Для щурів контрольної групи він склав 0,4, щурів з хронічним колітом – 0,44 та після корекції знижувався до 0,26 (рисунок 3.16). Отримані результати свідчать про значущий вплив після корекції протизапального інтерлейкіну -10.

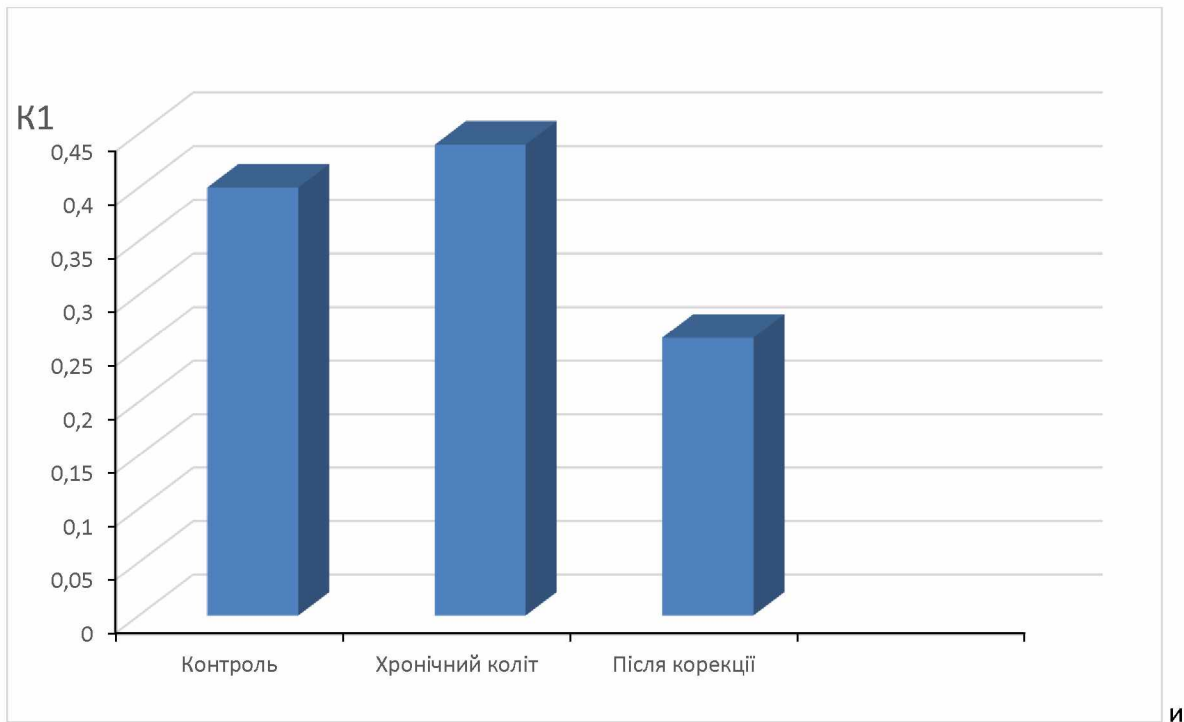


Рис. 3.16. Визначення коефіцієнту співвідношення прозапального IL-1 β до протизапального інтерлейкіну-10.

Далі ми розраховували K_2 – коефіцієнт співвідношення прозапального TNF- α до протизапального інтерлейкіну-10. У інтактних тварин коефіцієнт співвідношення склав 1,63, у щурів з хронічним колітом -1,406, а після корекції – 0,9. Це вказує на більш значущий вплив саме TNF- α у розвитку запального процесу за умов хімічно індукованого коліту. Після корекції визначається більш значущий вплив протизапального інтерлейкіну-10.

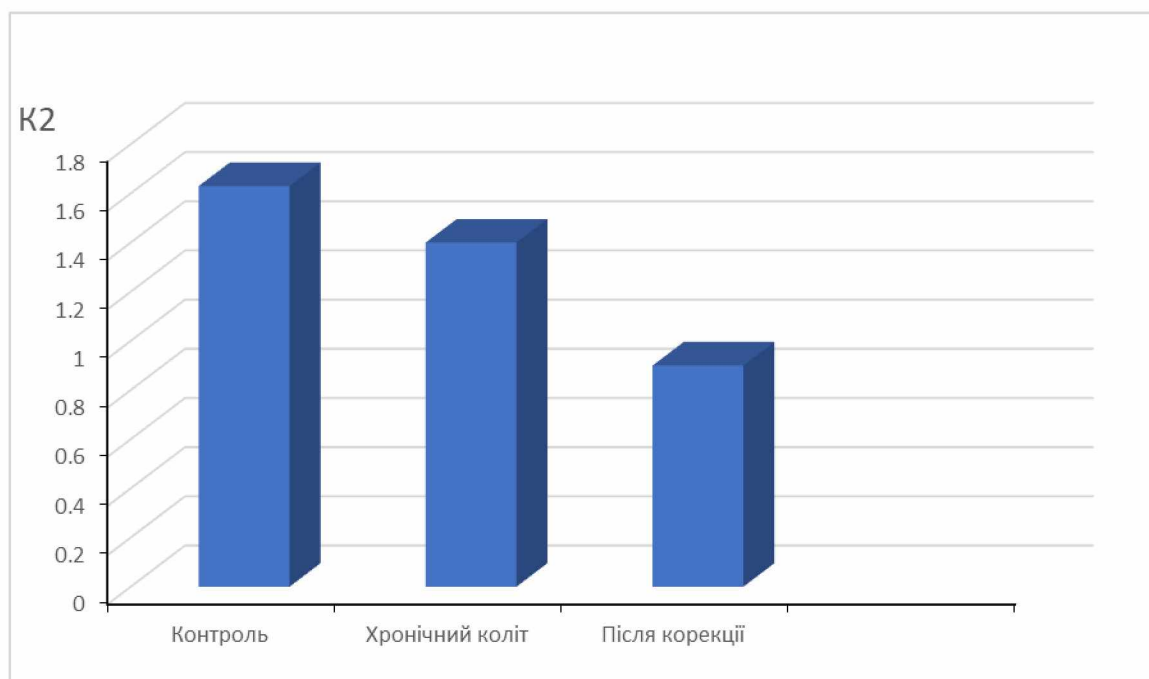


Рисунок 3.17. Визначення коефіцієнту співвідношення прозапального TNF- α до протизапального інтерлейкіну – 10.

3.8. Вплив перорального вживання декстрансульфат натрію на стан фосфоліпідного бішару лейкоцитів крові експериментальних тварин

У разі інтенсифікації ВРП, процесів перекисного окиснення ліпідів, виникнення оксидативного стресу в організмі щурів з експериментальним хронічним колітом, що підтверджується підвищенням вмісту в крові тварин біохімічного маркера раннього оксидативного стресу – 8 – ізопростану, можна припустити порушення стану фосфоліпідного бішару лейкоцитів, що найбільш залучені у запальний процес в організмі тварин.

За умов активації процесів ліпідної пероксидації та інтенсифікації апоптотичного процесу можуть виникати зміни фізико-хімічних характеристик мембран лейкоцитів: мікрров'язкість та плинність, що в подальшому призводить до змін функціональних характеристик клітинних мембран. Все це обумовлює актуальність дослідження впливу перорального застосування ДСН на структурно-функціональний стан мембран лейкоцитів та засобів корекції визначених порушень.

Цитоплазматичні мембрани (ЦПМ) складаються з сотень різних видів ліпідів і протеїнів. Саме складність хімічної структури ЦПМ забезпечує її фізико-хімічні властивості та різноманітність функцій. Розуміння хімічного складу та організації ЦПМ еволюціонувало протягом останнього століття з часу відкриття фосфоліпідного бішару, існування напівпроникних бар'єрів, що ізолюють клітину від зовнішнього середовища. Наразі існує рідинно-мозаїчна модель будови мембрани, яка постулювала, що ЦПМ є двовимірною рідиною з вбудованими білками, що перебувають у постійному русі. Однак науковцями було показано, що ЦПМ є латерально більш гетерогенною, а саме ліпіди відіграють значну роль у визначенні структури та функції ЦПМ [183].

Таким чином, клітинні мембрани - це складні ліпідно-протеїнові структури, бар'єрною функцією нагадують напівпроникні мембрани. Завдяки цьому відбувається взаємодія та зв'язок із позаклітинним середовищем. Мембранна плинність, модуляція функцій клітини визначається жирнокислотним складом фосфоліпідів у бішарі, відсотком холестеролу та його ефірів [183]. Зміни плинності цитоплазматичної мембрани впливають на бічну рухливість структурних протеїнів, білково-білкові взаємодії та дифузію протеїнів, що в подальшому впливає на трансдукцію сигналів від вбудованих у мембрану глікопротеїнових рецепторів і, отже, на реакцію клітин на стимули з навколишнього середовища [184].

Дослідження структури ліпід-білкових взаємодій виявили кілька протеїнових доменів, відповідальних за специфічне зв'язування з різними видами ліпідів. Серед фосфоліпід-зв'язуючих білків найвідомішими представниками є домени плекстринової гомології (PH), пальці PHD та PX, які розпізнають фосфатидилінозитол (PI), FYVE та C1 домени. PH - це домен, характерний для кіназ (PI3K, АКТ, ВТК). Домен PX присутній у сортувальних нексінах, що беруть участь у мембранному транспорті. FYVE - це цинк-пальцевий домен, який спочатку був ідентифікований у білках Fab 1, YOTB, Vac 1 (транспортний білок везикул) та EEA1 [185]. Домени C1 - це цинкові пальцеві домени, специфічні до ефірів форболу та діацилгліцеролу, що були виявлені в структурі протеїнкінази

С. Такі фосфоліпід-специфічні домени є поширеними в цитозольних протеїнах, зв'язаних з внутрішньоклітинним листком ЦПМ, мембраною органел або ендосом. Наразі отримані експериментальні дані також підтверджують роль плинності мембран у функціонуванні лейкоцитів. Зокрема, клітинні мембрани беруть участь у екстравазації нейтрофілів, включаючи взаємодію з ендотелієм судин, адгезію та діapedез [186]. Крім того, відомо, що зміни упорядкованості ліпідів цитоплазматичної мембрани зменшують рухливість лейкоцитів і хемотаксис [187].

Для проведення дослідження щодо оцінки фізико-хімічних змін фосфоліпідного шару цитоплазматичних мембран лейкоцитів використовували флуоресцентні зонди О6О (2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол), РН7 (2-(2'-ОН-феніл)-фенантро[9,10]-1,3-оксазол) та зонд О1О 2-(2'-гідроксіфеніл)-5-феніл-1,3-оксазол), що довели свою ефективність при оцінці стану мембран. Визначені флуоресцентні зонди є чутливими до змін протонодонорної здатності, полярності та в'язкості мікросередовища [188]. Для нашого дослідження саме обирали три флуоресцентних зонда для виявлення змін в різних ділянках мембрани. Використані зонди відрізняються за ліпофільністю та локалізацією у фосфоліпідному бішарі [189].

Визначено, що флуоресцентний зонд О1О розташовується в ділянці гліцеринових головок фосфоліпідів (центр ліпідного бішару), біля карбонільних груп фосфоліпідів та жирнокислотних ланцюжків фосфоліпідів, що знаходяться поряд зі карбонільними групами. Зонд О6О визначається в регіоні карбонільних груп фосфоліпідних молекул, жирно кислотних хвостів фосфоліпідів (поряд полярної частини бішару). Зонд РН7 визначається в області жирнокислотних хвостів молекул фосфоліпідів (біля центру бішару) та у центрі ліпідного бішару.

У ході проведення дослідження встановлено, що не спостерігалось статистично значущих змін ($p > 0,05$) у спектрі флуоресцентного зонда О6О, зв'язаного з лейкоцитами крові щурів, які перорально вживали розчин ДСН протягом 29 днів, порівняно з відповідним спектром зонда, зв'язаного зі суспензією лейкоцитів тварин контрольної групи (рис. 3.18).

Завдяки двосмугової флюоресценції можна застосовувати ратіометричні вимірювання, а саме використовувати співвідношення інтенсивності флюоресценції фототаумерної форми та вихідної форми з використанням I_T/I_N як параметру для оцінки фізико-хімічних властивостей мікросередовища мембрани.

Зокрема, числові значення співвідношень інтенсивності флюоресценції фототаутомеру та нормальної форми (I_T^* / I_N^*) зонда ОбО розраховані для щурів, які склали контрольну групу та щурів з експериментальним колітом, не відрізнялися (табл. 3.8).

Після проведення корекції патологічного стану наночастинками діоксиду церію було встановлено, що не спостерігалось статистично значущих змін ($p > 0,05$) у спектрі флюоресцентного зонда ОбО, зв'язаного з лейкоцитами крові щурів, які перорально вживали розчин наночастинок діоксиду церію протягом двох тижнів, порівняно з відповідним спектром зонда, зв'язаного з клітинами у суспензії лейкоцитів тварин контрольної групи. Числові значення співвідношень інтенсивності флюоресценції фототаутомеру та нормальної форми (I_T^* / I_N^*) зонда ОбО розраховані для щурів, які отримували та не отримували наночастинок діоксиду церію практично не відрізнялися (табл. 3.8).

Це свідчить про те, що на тлі перорального вживання наночастинок діоксиду церію, у фосфоліпідних мембранах лейкоцитів у регіонах, де локалізується зонд ОбО, не спостерігалось помітних змін фізико-хімічних властивостей: полярності та протондонорної здатності в ділянці карбонільних груп фосфоліпідів та області вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів (поблизу полярної області бішару).

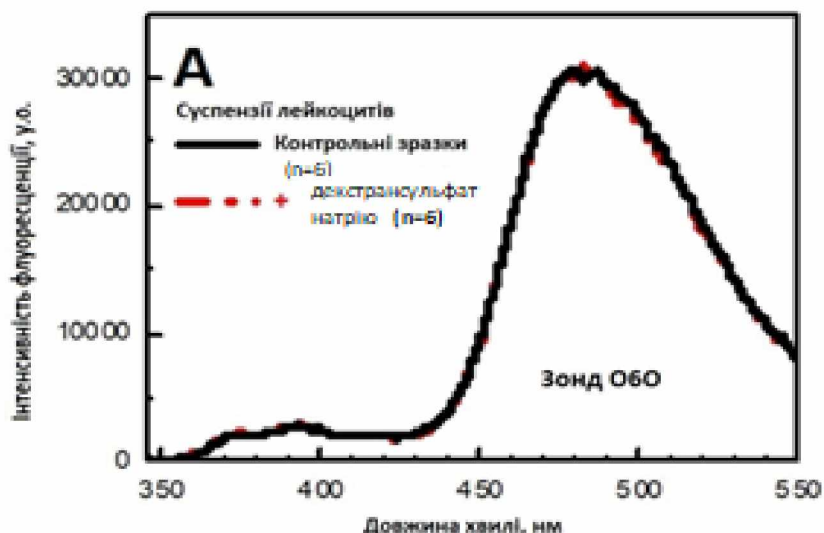


Рис. 3.18. Спектри флуоресценції зондів OB0 (A) у суспензіях лейкоцитів: (а) контрольна група щурів (чорна суцільна лінія), (б) тварини, які вживали розчин декстрансульфат натрію протягом 29 днів за схемою (червона пунктирна лінія). Для кращого порівняння спектри нормалізували до інтенсивності флуоресценції нормальної форми

Таблиця 3.8.

Співвідношення інтенсивності флуоресценції фототауамерної та нормальної форми (I_T^*/I_N^*) зондів OB0 та RH7 у мембранах лейкоцитів крові щурів, які перорально отримували розчин декстрансульфат натрію та інтактних тварин (Me [IQR])

Група тварин	Зонд OB0 (I_{482}/I_{395}), у.о.	Зонд RH7 (I_{485}/I_{425}), у.о.
Контрольна група (n=6)	10,7 [9,6; 12,3]	2,6 [2,3;3,1]
Щури, що отримували розчин DSS (n=6)	11,3 [9,4; 12,5], $p > 0,05$	2,5 [2,2; 3,3], $p > 0,05$
Щури, що отримували розчин SeO_2 (n=6)	10,5 [9,0; 11,9], $p > 0,05$; $p_1 > 0,05$	2,2 [1,9; 3,2], $p > 0,05$; $p_1 > 0,05$

Примітка: різниця вважалася статистично значущою при $p < 0,05$; p – у порівнянні з показником у інтактних тварин; p_1 – у порівнянні з показником у тварин з експериментальним колітом.

У разі використання нами флюоресцентного зонда RH7 спостерігалася незначна різниця між спектрами зонда у суспензії лейкоцитів, отриманих від

щурів, які перорально вживали розчин ДСН протягом 29 днів, та відповідними спектрами зонда, зв'язаного з лейкоцитами, отриманих від тварин контрольної групи (рис. 3.19). Проте ця різниця була статистично незначною ($p > 0,05$). Співвідношення інтенсивності флуоресценції фототаутомеру та нормальної форми (I_T^*/I_N^*) зонда RH7, що було розраховано для щурів у обох випадках, збігалися в межах статистичного аналізу (табл. 3.8). Це вказує на те, що у ліпідних мембранах лейкоцитів крові щурів, які вживали ДСН, у зоні, де локалізується RH7, не спостерігається значних змін у фізико-хімічних властивостях (тобто полярності та протондонорної здатності) в області вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів ближче до центру бішару (рис. 3.19).

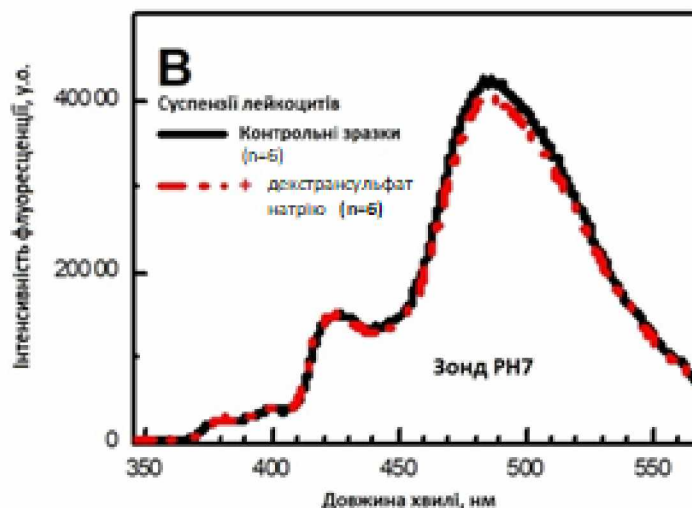


Рис. 3.19. Спектри флуоресценції зондів RH7 у суспензіях лейкоцитів: (а) контрольна група щурів (чорна суцільна лінія), (б) тварини, які вживали розчин декстрансульфат натрію протягом 29 днів за схемою (червона пунктирна лінія). Для кращого порівняння спектри нормалізували до інтенсивності флуоресценції нормальної форми.

Після проведення корекції патологічного стану наночастинками діоксиду церію було встановлено, що не спостерігалось статистично значущих змін ($p > 0,05$) у спектрі флуоресцентного зонда RH7, зв'язаного з лейкоцитами крові щурів, які перорально вживали розчин наночастинок діоксиду церію протягом

двох тижнів, порівняно з відповідним спектром зонда, зв'язаного з суспензією лейкоцитів тварин контрольної групи. Числові значення співвідношень інтенсивності флуоресценції фототаутомеру та нормальної форми (I_T^* / I_N^*) зонда RH7 розраховані для щурів, які отримували та не отримували наночастинки, діоксиду церію практично не відрізнялися та склали 2,5 та 2,2 відповідно. Загалом можна зробити висновок, що пероральне вживання ДСН не впливає на стан фізико-хімічних властивостей мембран лейкоцитів в області від хвостів жирних кислот, що входять до структури фосфоліпідів до центру фосфоліпідного бішару в областях розташування зондів RH7.

У нашому експериментальному дослідженні ми також використовували найбільш інформативний зонд O1O, параметри флуоресценції якого залежать від полярності та протонно - донорної здатності мікрооточення. При додаванні зонду O1O, він розташовується в регіоні гліцеролових залишків фосфоліпідів, що знаходяться ближче до центру ліпідного бішару; в областях карбонільних груп та вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів [190]. На рисунку 3.20 надано схему реакції внутрішньомолекулярного транспорту протону у збудженому стані в зонді O1O.

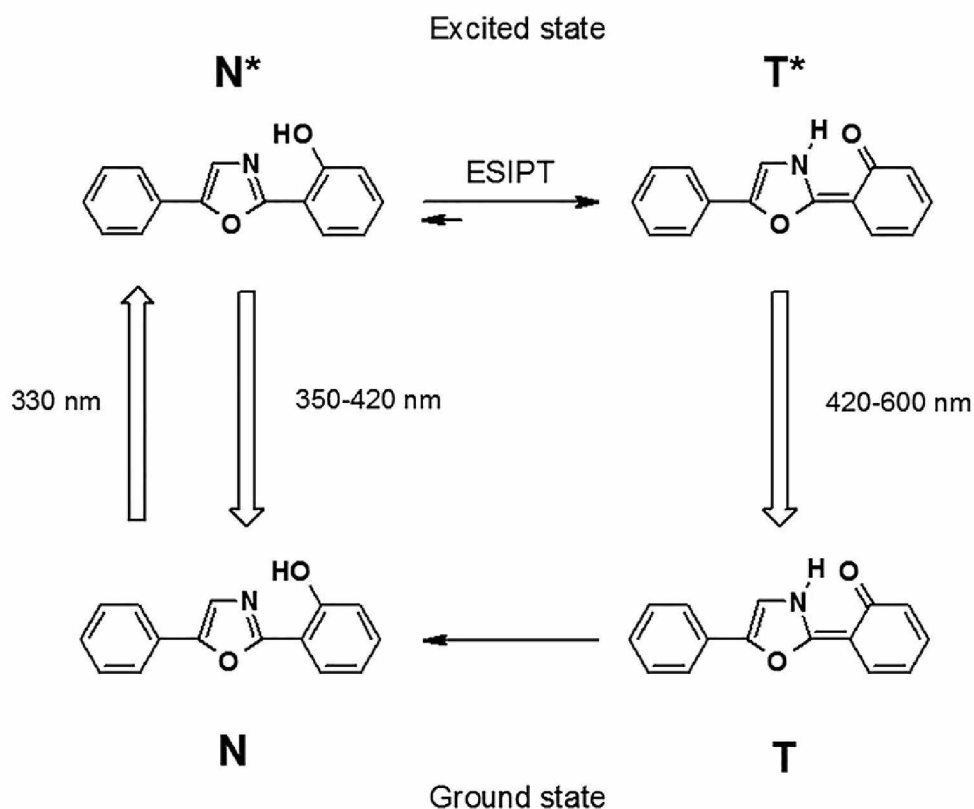


Рис. 3.20. Реакція внутрішньомолекулярного переносу протону у збудженому стані в зонді О1О. Стрілкою вгору зазначено електронне збудження, стрілкою донизу – флюоресценцію. Максимуми поглинання та випромінювання зазначено в нм (за модифікацією Посохова Є.О.) [190].

Таким чином, було виявлено, що найбільш значні результати були отримані при використанні флуоресцентного зонду О1О. Співвідношення I_T/I_N у щурів контрольної групи склало 2,51, у щурів з хронічним колітом - 3,54. У нашому дослідженні спостерігали збільшення співвідношення інтенсивності флюоресценції I_T/I_N у щурів з експериментальним колітом, що на 41,0 % вище показника у порівнянні з групою контролю (рис. 3.21). Це вказує на зменшення полярності та протонодонорної здатності мікрооточення зонда О1О [190] в мембранах лейкоцитів крові щурів за умов хімічно індукованої моделі експериментального коліту. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію співвідношення інтенсивності флюоресценції I_T/I_N знижувалося на 10,2 % та склало 3,18, однак не знижувалося до значень у щурів контрольної групи - на 26,7 % було вище показника у порівнянні з щурами контрольної групи.

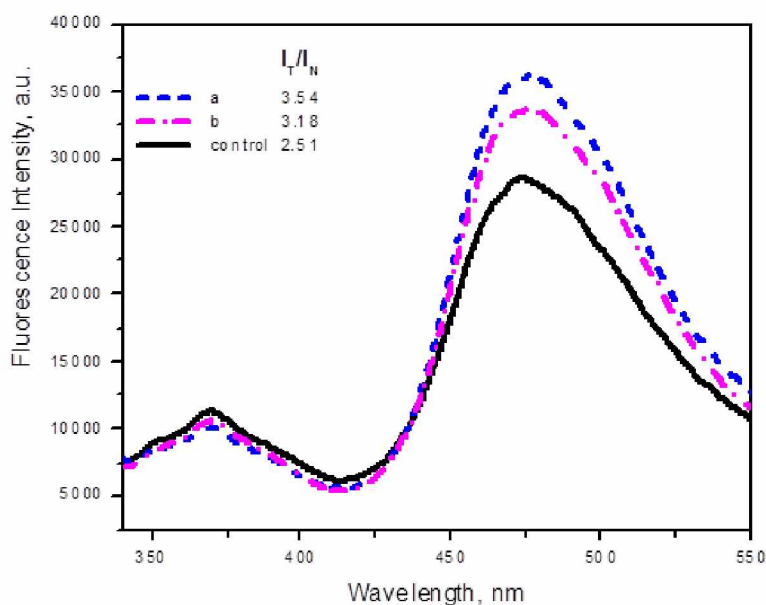


Рисунок 3.21. Спектри флуоресценції зондів ОІО у суспензіях лейкоцитів: контрольна група щурів (чорна суцільна лінія), (а) тварини, які вживали розчин декстрансульфат натрію протягом 29 днів (синя пунктирна лінія), (b) тварини, яким проводили корекцію діоксидом церію (рожева пунктирна лінія). Для кращого порівняння спектри нормалізували до інтенсивності флуоресценції нормальної форми.

Отримані данні свідчать про дегідратацію мембрани та підвищення ліпідного упорядкування фосфоліпідів мембран лейкоцитів [191].

Таким чином, результати нашого дослідження свідчать про більш високу дегідратацію мембран лейкоцитів крові щурів у зоні карбонільних груп фосфоліпідів та в області вуглеводневих ланцюгів фосфоліпідів поблизу полярної області бішару. Дегідратація, в свою чергу, вказує на збільшення ліпідної упорядкованості (тобто зменшення плинності) мембран лейкоцитів. Отримані результати можуть свідчити про посилення процесів перекисного окиснення ліпідів в організмі щурів з хімічно індукованим колітом. Вважається, що електростатичні взаємодії між позитивно зарядженими ділянками фосфоліпідів та негативно зарядженими сульфурвмісними групами ДСН можуть лежати в основі змін ліпідів у мембранах. Одним з припускань є те, що

збільшену в'язкість та упорядкованість ліпідів в мембранах лейкоцитів, що зазнали впливу ДСН, можна пояснити взаємодією ДСН та його метаболітів з позитивно зарядженою поверхнею зовнішнього шару мембрани імунних клітин. Крім того, подібні зміни можуть вказувати на дегідратацію мембран і, отже, збільшення упорядкованості ліпідного бішару, можуть розвинути у відповідь на активацію перекисного окислення ліпідів [192], оскільки ПНЖК, що містяться в клітинних мембранах, схильні до вільнорадикального окислення, спричиненого надмірною генерацією АФК нейтрофілами.

Хімічно індуковане порушення фізико-хімічних властивостей фосфоліпідного бішару мембрани лейкоцитів в зоні мікрооточення зонда О1О може бути пов'язано з порушеннями редокс-статусу клітин, а саме з розвитком оксидативного стресу та підвищенням ліпідної пероксидації.

Відомо, що плинність клітинних мембран, в першу чергу, підтримується ПНЖК, що входять до складу фосфоліпідів, завдяки їх більшій гнучкості та здатності упаковуватись менш щільно. На відміну від плинності, в'язкість підтримується відсотком насичених жирних кислот, оскільки вони здатні максимізувати ван дер Ваальсові сили [193]. Перекисне окислення ліпідів передбачає переважно вільнорадикальне окислення ПНЖК в клітинних мембранах, в подальшому із втратою їх цілісності та збільшенням їх проникності. В результаті ліпідної пероксидації клітинні мембрани стають більш в'язкими, жорсткими та впорядкованими завдяки порівняно більшому відсотковому вмісту насичених жирних кислот у молекулах фосфоліпідів мембран [194].

У цьому дослідженні не виявлено статистично значущих змін у флуоресценції двох зондів у суспензіях лейкоцитів крові щурів, що зазнали впливу наночастинок діоксиду церію та від контрольної групи. Отримані дані свідчать про те, що пероральне споживання наночастинок діоксиду церію незначно впливає, а саме на активацію перекисного окислення ліпідів у мембранах лейкоцитів, оскільки перекисне окислення ліпідів призводить до збільшення флуоресценції зондів О6О та РН7. Більше того, згадані зонди

розташовуються в гідрофобних областях молекул фосфоліпідів, де знаходяться ПНЖК. Отже, зміни спектрів флуоресценції зондів O6O і RH7 у суспензіях лейкоцитів не вказують на те, що ПНЖК в мембранних фосфоліпідах залишаються цілими і не зазнають вільнорадикального окислення.

На відміну від перекисного окислення ліпідів, апоптоз збільшує плинність мембрани та зменшує її впорядкованість. Флуоресценція зондів O6O і RH7 повинна бути значно зменшена в апоптотичних клітинах [195], чого не спостерігається в цьому дослідженні. Отже, можна припустити, що пероральний вплив наночастинок діоксиду церію протягом двох тижнів не викликає активації апоптозу лейкоцитів, що підтверджується результатами нашого дослідження.

Повідомлялося, що діоксид церію може впливати на стан клітинних мембран, роблячи їх менш проникними та знижуючи стабільність електропор [196]. Однак отримані у даній роботі дані свідчать про те, що нанорозмірні частинки не викликають таких змін у мембранах. Ми можемо припустити, що на наномасштабному рівні подібних ефектів не спостерігається.

Відсутність змін у стані бішару фосфоліпідних лейкоцитів у клітинних мембранах вказують на те, що наночастинок діоксиду церію не мають мембранотоксичної дії при пероральному вживанні протягом 2 тижнів. Не виявлено змін фізико-хімічних властивостей мембран лейкоцитів у районі від карбонільних груп фосфоліпідів до центру фосфоліпідного бішару у щурів.

Таким чином, аналіз стану мембран лейкоцитів не виявив змін в області розташування зондів O6O та RH7, тобто в регіонах карбонільних груп фосфоліпідних молекул та хвостів жирних кислот в фосфоліпідах та біля центру бішару, у центрі ліпідного бішару мембрани. Було показано зміни в зоні розташування флуоресцентного зонду O1O – в області гліцеринових головок фосфоліпідів, в області карбонільних груп та жирно кислотних ланцюжків фосфоліпідів.

РОЗДІЛ 4.

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КИШКІВНИКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТ НАТРІЮ

Згідно завдань та дизайну нашого експериментального дослідження, на наступному етапі було визначено морфологічні особливості товстої кишки щурів контрольної групи та експериментальної групи за умов вживання декстран сульфат натрію протягом 39 днів. Проведено оглядову мікроскопію препаратів товстої кишки, забарвлених гематоксиліном та еозином [197].

У щурів, що склали контрольну групу (вживали питну воду), стінка товстої кишки була представлена наступними шарами: слизовою оболонкою, підслизовою основою, м'язовим шаром та серозну оболонкою. Спостерігаються достатньо розвинуті крипти, що містять достатню кількість келихоподібних клітин.

У інтактних тварин слизова оболонка вислана епітелієм, усі структурні компоненти слизової оболонки товстої кишки були збережені. Поверхневий епітелій, що вистилав кишку, був представлений як циліндричними, так й келихоподібними непошкодженими клітинами. Власна пластинка була тонкою з незначною інфільтрацією лейкоцитами (рис. 4.1, А, В).

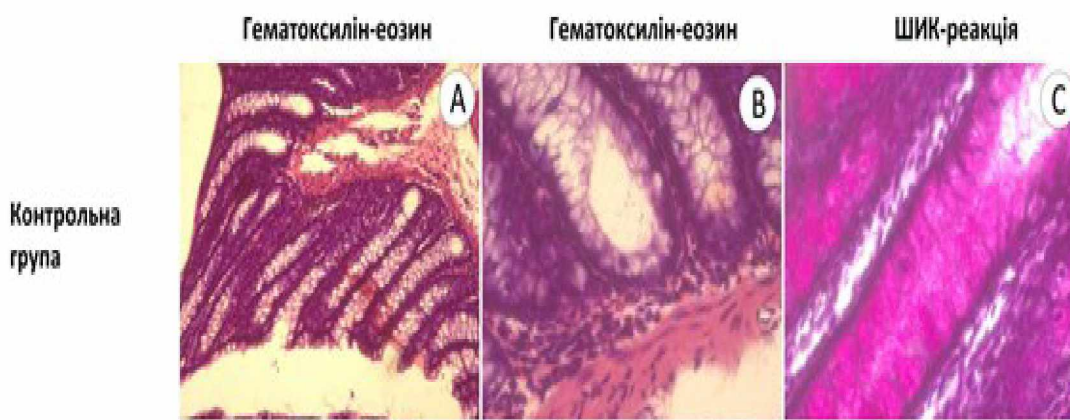


Рис. 4.1 Мікропрепарати товстої кишки. Фарбування гематоксилін-еозином (А – тварина №2 з групи контролю, $\times 100$; В – тварина №3 з контрольної групи, $\times 400$); ШИК - реакція (С – представник №4 з контрольної групи, $\times 400$).

Ділянки слизової оболонки товстої кишки з більш значною інфільтрацією можна було помітити у нижніх відділах кишківника. В криптах товстої кишки було виявлено муцин-секретуючі стовпчасті келихоподібні клітини, наповнені муцином, що є фуксинофільним (рис. 4.1., А, В). На тлі перорального вживання декстран сульфат натрію протягом 39 днів товста кишка у щурів з експериментальних груп визначалась достатньо дилатованою. Шар слизової оболонки кишки був тонкий. В деяких ділянках слизової оболонки кишечника поверхневий епітелій був десквамований (рис. 4.2, Д).

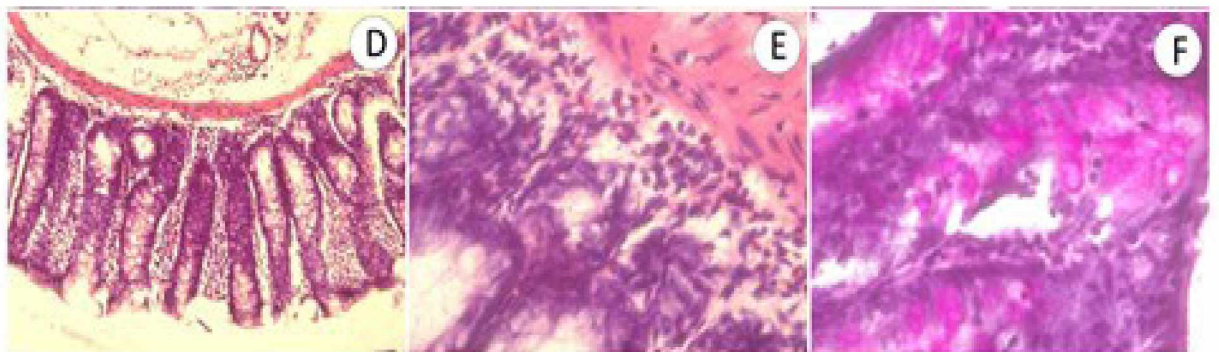


Рисунок 4.2. Мікропрепарати товстої кишки. Фарбування гематоксилін-еозіном (D – щур №5 з експериментальної групи з введенням ДСН per os, x100; E - щур №1 з експериментальної групи з введенням ДСН per os, x400). ШИК-реакція (F - щур №2 з експериментальної групи з введенням ДСН per os, x400).

Крипти товстої кишки були вкриті келихоподібними клітинами, кількість яких візуально зменшилась. Клітини були менш фуксинофільними в порівнянні з морфологічною картиною у щурів з контрольної групи. Власна пластинка була достатньо товстою по всьому шару слизової оболонки та помітно інфільтрована макрофагами та лімфоцитами, а також визначалися еозинофіли у достатній кількості. Візуально епітеліальний вистил крипт також містив велику кількість лейкоцитів (рис.4.2, E). Власна пластинка та підслизовий шар, прилеглий до м'язового шару, були достатньо товстими та більш інфільтровані клітинами, порівняно зі зразками товстої кишки від тварин контрольної групи.

Отримані дані морфологічного дослідження зразків товстої кишки вказують: на пошкодження епітеліального бар'єру і, як можливий наслідок,

підвищену проникність слизової оболонки стінки кишечника, що може сприяти залученню мікробіоти товстої кишки в патологічний процес.

У товстій кишці морфологічні зміни вказують на прискорену клітинну регенерацію поверхневого епітелію у тварин, що тривалий час отримували ДСН, та свідчить про пошкодження епітеліальних клітин з їх подальшою загибеллю. Необхідно зазначити, що при порівнянні інтенсивності пошкодження епітеліального шару у товстій кишці на тлі ДСН встановлено, що епітелій товстої кишки страждав більшою мірою у відповідь на ДСН, регенеративних можливостей було недостатньо для повного відновлення епітеліального шару. Це свідчить про те, що коліт, що виникає на тлі перорального вживання ДСН, протікає з залученням слизової оболонки товстої кишки у патологічний процес.

На мікроскопічних препаратах визначалися: альтеративно-десквамативні зміни в поверхневому епітелію та епітелію кишкових залоз (крипт); дифузна поліморфно-клітинна інфільтрація в слизовій оболонці товстої кишки, яка місцями поширюється на підслизову основу (рис. 4.3, а).

Відомо, що мікроскопічні ознаки виразкової хвороби товстої кишки - це складна комбінація запальних змін і структурних порушень. Діагноз коліту, в першу чергу, передбачає зміни клітинного інфільтрату власної пластинки. Ці зміни, в свою чергу, можна поділити на зміни щільності, складу та розподілу. Зміни щільності (збільшення щільності клітинного інфільтрату) передбачають збільшення кількості клітин, що виявляється при гістологічному дослідженні зразків, отриманих під час експериментального дослідження. У щурів з групи контролю інфільтрат локалізується у верхній частині слизової оболонки, тоді як в експериментальних групах (пероральне введення декстрансульфат натрію) інфільтрат поширюється на ділянки, які розташовані нижче, захоплюючи всю слизову оболонку кишки.

Дифузний характер збільшення щільності клітинного інфільтрату має як вертикальний, так і латеральний характер. Зміни складу клітинного інфільтрату характеризуються накопиченням плазматичних клітин у глибоких відділах слизової оболонки і, зокрема між основою крипт і м'язовою оболонкою слизової

оболонки (так званий базальний плазмоцитоз). Окрім запальної інфільтрації у власній пластинці слизової оболонки, вміст лімфоїдних скупчень і лімфоїдних фолікулів збільшується (рис.4.3, а).

На рисунку 4.3. можна побачити розвиток змін, характерних для розвитку запального процесу в товстій кишці. А саме: визначається дифузна поліморфноклітинна інфільтрація слизової оболонки товстої кишки (а), за допомогою забарвлення гематоксиліном та еозином; спостерігається відсутність вогнища ішемії у щурів контрольної групи (b) та можна побачити вогнищеву ішемічну ділянку в слизовій оболонці товстої кишки (с) у щурів з експериментальним хронічним колітом за допомогою забарвлення за Rego,; визначається активна рівномірна проліферативна активність в слизовій оболонці товстої кишки без ознак ішемії (d) та поява нерівномірного вогнища зі зниженою проліферації над вогнищем ішемії (e).

Також нами було проведено дослідження експресії білка Ki-67 – маркеру клітинної проліферації з використанням методів ІГХ. Відомо, що важливою мікроскопічною ознакою гострого коліту є наявність нейтрофільних лейкоцитів в інфільтраті. У поєднанні з ознаками пошкодження епітелію вони є морфологічним проявом активності.

Крім появи нейтрофільних лейкоцитів в клітинному інфільтраті, вони виявляються в поверхневому і криптовому епітелії (криптит), що призводить до ерозії та руйнування крипт товстої кишки.

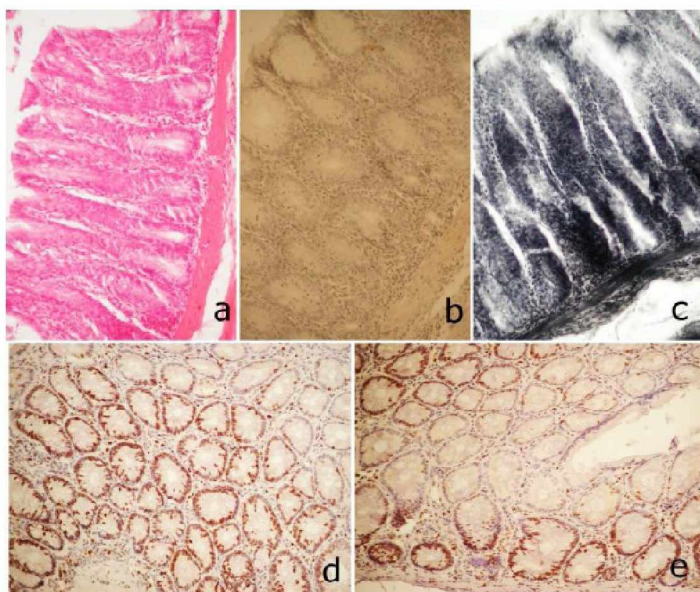


Рисунок 4.3. Запальні зміни в товстій кишці. Дифузна поліморфноклітинна інфільтрація слизової оболонки, забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 200$ (a); відсутність вогнища ішемії (b) та вогнищева ішемічна ділянка в слизовій оболонці товстої кишки (c), забарвлення за Rego, збільшення $\times 200$; активна рівномірна проліферативна активність в слизовій оболонці товстої кишки без ознак ішемії (d) та поява нерівномірного вогнища зі зниженою проліферації над вогнищем ішемії (e), імуногістохімічне дослідження Ki-67, збільшення $\times 200$.

Дослідження мазків, забарвлених за Rego, в експериментальних та контрольній групах виявило наявність нерівномірного вогнища чорного кольору як у слизовій оболонці, так і у власній пластинці, що слід розпізнати як ділянку ішемії (рис. 4.3, c). Але, якщо для контрольної групи вона є незначною, то для експериментальних груп з запальним процесом кишки вона є статистично достовірною ($p < 0,05$), де ділянка ураження досягає $13,09 \pm 0,67\%$ (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Результати морфометричного дослідження мікропрепаратів товстої кишки у інтактних тварин та шурів з експериментальним хронічним колітом

Показники	Досліджувані групи тварин	
	Дослідна група, (n=6)	Контрольна група, (n=6)
Область ішемії, %.	13.09±0.67*	3.79±0.38
Експресія Ki-67 у всій ділянці, (% позитивних клітин)	49.66±3.28*	24.32±2.46
Експресія Ki-67 в ділянці без ішемії, (% позитивних клітин)	57.71±4.68*	25.39±2.02
Експресія Ki-67 в ділянці з ішемією, (% позитивних клітин)	18.06±3.33 ^{a#}	13.41±1.88 ^{a#}

Примітка: * - $p < 0,05$ достовірна різниця між досліджуваними групами та групою контролю; ^a - $p < 0,05$ достовірна різниця між показниками ділянки без ішемії та з ішемією; # - $p < 0,05$ достовірна різниця між усіма показниками ділянки та ділянкою з ішемією.

Наразі визначено, що білок Ki-67 є універсальним біохімічним маркером для оцінки проліферативної активності [198, 199, 200]. Антитіла до Ki-67 мають проліферативні клітини, що знаходяться у різних фазах циклу. Саме Ki-67 є надійним маркером проліферації. Антиген Ki-67, що виявляється відповідними моноклональними антитілами, є протеїном з коротким циклом існування, який руйнується протягом 1,5–2 год. Тому антитіла до Ki-67 виявляють тільки клітини, що діляться. У точці G₀ клітинного циклу протеїн не виявляється, як і на початок G₁-фази. Ki-67 з'являється наприкінці фази G₁, його рівень поступово зростає протягом S-фази і досягає максимуму під час мітозу [201].

Ki-67 є надійним індикатором проліферації практично у всіх злоякісних новоутвореннях людини, у тому числі в тканині раку молочної залози. На думку деяких авторів, зниження рівня Ki-67 у операційному матеріалі хворих вказує на чутливість раку молочної залози до медикаментозного лікування, у той час як

підвищення експресії цього показника асоціюється з несприятливим перебігом пухлинного процесу [201, 202].

Виявлення проліферативної активності залежно від ознак ішемії реалізувалося на різному рівні експресії Ki-67. Так, найнижчий рівень Ki-67 визначався в слизовій оболонці кишки над гладком'язовими волокнами, забарвленими в чорний колір, зі статистично достовірними значеннями (табл. 4.1). У контрольній групі такі ділянки були незначними, але їх розширення в групі запалення відбувалося за наявності вогнища без експресії Ki-67.

Найбільш виражена експресія Ki-67 була в експериментальних групах щурів з хронічним колітом в ділянці, не пов'язаній з ішемією (рис. 4.3, е), і становила навіть $57,71 \pm 4,68$ % ($p < 0,05$). Виявлено сильний негативний кореляційний зв'язок між Ki-67 та площею ішемії ($r = -0,819$).

Ki-67 був сильно експресований в епітеліальних клітинах товстої кишки як в інтактній тканинах, так і при моделюванні ЗЗК з достовірним збільшенням експресії більш ніж удвічі в групі запалення ($p < 0,05$), але поширення активності процесу було нерівномірним. Співставлення слайдів із забарвленням імуногістохімічним та забарвленими за Rego дозволило виявити сильний негативний кореляційний зв'язок між експресією Ki-67 та ішемією ($r = -0,819$).

Таким чином, за умов перорального вживання ДСН у щурів виникає коліт. За умов імуногістохімії Ki-67 був сильно експресований в епітеліальних клітинах товстої кишки як в інтактних тканинах, так і при моделюванні запального процесу в товстій кишці, викликаного декстрансульфат натрієм з достовірним збільшенням експресії більш ніж удвічі в групі запалення ($p < 0,05$), але поширення активності процесу було нерівномірним.

Для уточнення аналізу клітинного інфільтрату власної пластинки, який спостерігався при фарбуванні тканини товстої кишки у разі вживання ДСН, було проведено імуногістохімічне дослідження з використанням маркерів: Т-лімфоцитів (CD3) та макрофагів (CD68). Аналіз експресії маркеру Т-лімфоцитів (CD3) показав, що CD3⁺ клітини візуалізуються у власній пластинці товстої кишки як у інтактних щурів (рис. 4.4, а, б) так й у щурів на тлі перорального

вживання декстрансульфат натрію (рис.4.5, с, d). Їх розподіл був переважно дифузним. Для кількісної оцінки експресії CD3 у групах тварин порівнювалася загальна кількість CD3⁺ клітин на одиницю площі та розраховувалося співвідношення CD3⁺ клітин до CD3⁻ клітин. Встановлено, що за умов перорального вживання ДСН спостерігається збільшення абсолютної кількості CD3⁺ клітин у власній пластинці (рис. 4.4). Різниця була статистично значущою і перевищувала 40 % порівняно з показниками у щурів контрольної групи. Відсоток CD3⁺ клітин також був майже втричі вище (табл. 4.2).

Слід зазначити, що подібні зміни спостерігалися також й в експресії CD68, що є панмакрофагальним маркером, у слизовій оболонці товстої кишки (рис. 4.4, 4.5).

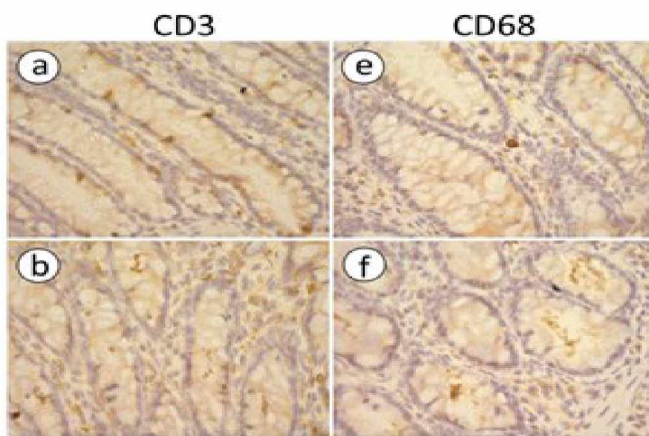


Рис. 4.4. Експресія CD3 та CD68 у товстій кишці щурів з контрольної групи (a – CD3, щур №2; b – CD3, щур №5; e – CD68, щур № 3; f – CD68, щур №6); x400.

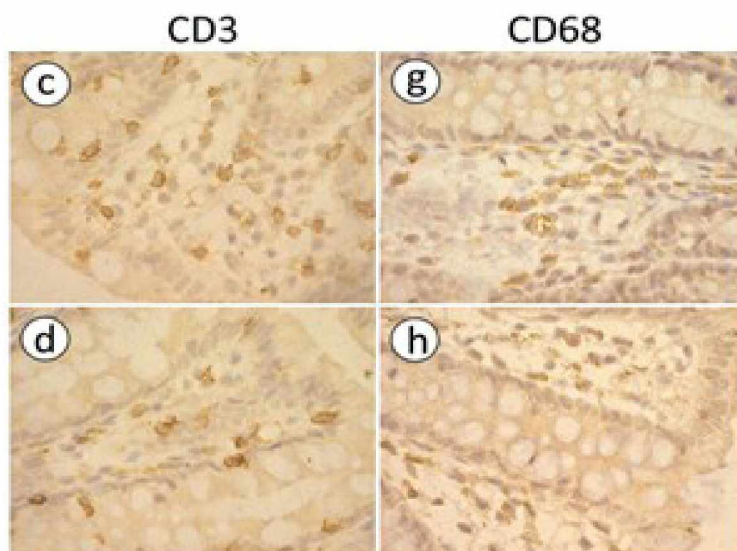


Рис. 4.5. Експресія CD3 та CD68 у товстій кишці щурів, які перорально вживали декстрансульфат натрію (с – CD3, щур №1; d – CD3, щур №4; g – CD68, щур №2; h – CD68, щур №5). $\times 400$.

Кількість клітин, що експресують цей макрофагоспецифічний антиген у власній пластинці товстої кишки, була більш ніж на 50 % вищою, ніж у щурів, які отримували ДСН. Різниця між групами була статистично значущою. Далі розраховували співвідношення CD68⁺ клітин до CD3⁻ клітин, цей показник був більш ніж у 3 рази вищим у щурів, які вживали ДСН, ніж у представників контрольної групи (табл. 4.2). Необхідно зазначити, що визначалася різниця у дистриб'юції клітин у власній пластинці. Зокрема, на відміну від Т-лімфоцитів, що розміщувалися переважно дифузно, макрофаги утворювали скупчення, що склалися з переважної кількості клітин.

Таблиця 4.2.

Експресія CD3 та CD68 у власній пластинці товстої кишки щурів з хронічним колітом за умов вживання декстрансульфат натрію

Групи тварин	Контрольні тварини (n=6)	Щури, які вживали ДСН (n=6)
Показники		
Кількість CD3 ⁺ клітин	2,26±1,3	3,3±0,9 p<0,0001
Співвідношення CD3 ⁺ клітин до CD3 ⁻ клітин	0,17±0,08	0,46±0,12 p<0,0001
Кількість CD68 ⁺ клітин	2,2±1,3	3,5±1,1 p<0,0001

Співвідношення CD68 ⁺ клітин до CD68 ⁻ клітин	0,13±0,07	0,42±0,11 p<0,0001
---	-----------	-----------------------

Примітка: різниця вважалася статистично достовірною при значеннях p менше 0,05.

Відомо, що біля 70 % імунних клітин організму перебувають у кишечнику. На теперішній час вважається, що слизова оболонка кишечника є бар'єром для патогенних об'єктів та постійно перебуває у стані «фізіологічного запалення». Таким чином, кількісна оцінка імунних клітин у слизовій оболонці кишечника є ключовим моментом для виявлення запального процесу низької інтенсивності, при якому навіть не відбуваються суттєві морфологічні зміни [203]. Слизова оболонка товстої кишки являє собою бар'єрну тканину, є унікальним імунним середовищем, де відбувається скупчення імунних клітин, що проявляють толерантність до різноманітних родів мікробів, мікробіому. Мікробіом має вирішальне значення для здоров'я, функціонування ШКТ, а дисбаланс умовно-патогенних і патогенних мікробів пов'язаний з розвитком багатьох захворювань, зокрема запальних процесів в кишечнику. Таким чином, гомеостатичні відносини між імунними клітинами та мікробіомом товстої кишки людини, має вирішальне значення в патогенезі патологічного процесу. Імунна система кишечника має симбіотичні відносини з мікробіомом і відіграє центральну роль у підтримці цілісності епітеліального бар'єру. Власна пластинка та пов'язані з нею лімфоїдні тканини містять одну з найбільших і найрізноманітніших спільнот імунних клітин, що включає як лімфоцити, так і мієлоїдні клітини. Існує помітна регіональна варіабельність імунних клітин вздовж шлунково-кишкового тракту, причому кількість Т-хелперів (ТН) 17 зменшується від дванадцятипалої до товстої кишки, а кількість Т-регуляторних клітин є найвищою в товстій кишці. Імунні клітини можуть реагувати на сигнали навколишнього середовища, включаючи мікробіоту. Зміни у співвідношенні та стані активації Т- і В-клітин у різних ділянках товстої кишки здорової людини від проксимального до дистального відділів пов'язано зі зміною мікробіоти.

Результати нашої роботи вказують, що пероральне вживання ДСН супроводжується інфільтрацією власної пластинки товстої кишки макрофагами та Т-лімфоцитами, що свідчить про розвиток коліту.

Таким чином, дані імуногістохімічного дослідження маркерів імунних клітин корелюють з результатами морфологічних досліджень і підтверджують наявність коліту. Особливості інфільтрації стромы товстої кишки можуть свідчити про залучення мікробного компоненту до патогенезу ДСН-індукованого запалення кишківника, оскільки більшість CD3⁺ та CD68⁺ клітин скупчуються в зонах пошкодженого епітеліального бар'єру, які можуть бути вхідними воротами для мікробів. Було визначено, що декстрансульфат натрію сприяє: розвитку та посиленню запального процесу через порушення складу мікробіоти кишківника, подальшому поширенню патогенної мікробіоти. Отримані нами дані особливостей інфільтрації кишківника Т-лімфоцитами та макрофагами частково підтверджують цю гіпотезу.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як відомо з сучасних джерел наукової літератури проблема поширення хронічних запальних захворювань кишечника, зокрема неспецифічного виразкового коліту та хвороби Крона, набуває актуальності через постійне зростання захворюваності, розповсюдження переважно серед молодого працездатного населення. За умов запальних захворювань кишечника виникають ускладнення: перфорація кишечника, кишкові кровотечі, стриктури, виникнення колоректального раку тощо. Внаслідок чого зростає ризик інвалідизації, зокрема людей молодого віку, що обумовлює соціально-економічну значущість проблеми [2, 3].

На теперішній час не існує єдиної концепції у розумінні етіопатогенезу запальних захворювань кишечника. На думку вчених, розвиток ЗЗК обумовлений комбінованим впливом низки факторів як зовнішнього середовища (вестернізований тип харчування, шкідливі звички, нервовий стрес тощо), так і генетичних факторів (високий розвиток ЗЗК у родичів першої лінії хворих на ХК чи НБК). Описано більше ніж 100 генів, відповідальних за розвиток ЗЗК, серед яких найбільш вивчений ген CARD15, що відповідає за синтез протеїна, необхідного для розпізнавання бактерій у просвіті кишечника та має домен активації каспази [4]. У патогенезі ЗЗК враховуються й особливості складу мікробіоти кишечника, а саме дисбаланс коменсальної мікробіоти зі збільшенням кількості патогенних мікроорганізмів та неадекватна регуляція імунітету слизової оболонки у відповідь на стимуляцію (дисбаланс цитокінової регуляції з подальшим запуском аутоімунних механізмів) [6]. За умов розвитку запального процесу в кишечнику нейтрофіли та моноцити є головним джерелом АФК для боротьби з інфекцією з пошкодженням оточуючих тканин .

Таким чином, вивчення етіопатогенетичних механізмів розвитку ЗЗК є актуальною проблемою гастроентерології та медичної біохімії. Для вивчення патофізіологічних механізмів захворювань застосовують різноманітні

експериментальні моделі індукції ЗЗК у тварин, зокрема щурів. Існує ціла низка різноманітних моделей розвитку НВК та ХК у тварин, які умовно можна поділити на чотири групи: спонтанні коліти (з використанням тварин-носіїв певних генів, що супроводжується розвитком важкого коліту), індуковані коліти (з використанням різноманітних хімічних речовин, таких як оцтова кислота, ДСН, ТНБС, оксазолон, каррагенан тощо, що спричиняють хімічне або механічне руйнування СО), моделі адаптивного переносу у тварин зі скомпрометованою імунною системою (перенос Т-клітин від здорових донорів до реципієнтів з тяжким комбінованим імунодефіцитом) та моделі з використанням генетично модифікованих тварин (нокаутні, трансгенні тварини тощо) [14, 15, 16]. Кожна група експериментальних моделей має свої переваги та недоліки. Для проведення своєї експериментальної роботи ми обрали модель хімічно індукованого коліту із застосуванням ДСН через відносно дешевизну та легкість відтворення гострого та хронічного запалення товстої кишки. В нашій експериментальній роботі було залучено 36 дорослих щурів популяції WAG віком 4-5 міс, вагою 225-240 гр, яких було поділено на 3 групи (контрольна група та дві експериментальні) по 6 тварин у кожній з проведенням 2 серій експерименту. Контрольна група включала інтактних тварин, які вживали чисту питну воду. Перша експериментальна група включала щурів з експериментальним колітом, які перорально отримували 2,5 % розчин ДСН у питній воді за наступною схемою: з 1-ї по 5-ту добу, з 13-ї по 17-ту добу, з 25-ї по 29-ту. З 6-ї по 12-ту добу, з 18-ї по 24-ту, з 30-ї по 38-му добу щури даної групи отримували чисту питну воду. На 39-ту добу тварин виводили з експерименту шляхом цервікальної дислокації. Друга експериментальна група включала щурів, яким після індукції хронічного ДСН-коліту проводили корекцію патологічного стану шляхом перорального введення 0,5 мл 1% розчину наночастинок діоксиду церію протягом 14 діб, починаючи з 39-ї доби. Тварин цієї групи виводили з експерименту на 54-ту добу шляхом цервікальної дислокації. Також важливо зазначити, що перебіг НВК та ХК суттєво відрізняється в залежності як від ступеня тяжкості, так і серед пацієнтів,

обумовлює необхідність індивідуального підходу у підборі терапевтичної схеми. Через те, що етіологія ЗЗК лишається невідомою, терапія ЗЗК – симптоматична, тому поглиблення знань про біохімічні та патофізіологічні механізми розвитку хронічного запалення кишечника, а також пошуки альтернативних способів корекції цього стану залишається важливим напрямком у сучасній медичній науці.

Метою роботи було морфологічне та біохімічне дослідження механізмів розвитку хронічного запалення кишечника на тлі перорального прийому 2.5 % розчину (вага/об'єм) декстрансульфату натрію (ДСН) молекулярної маси 40 кДа, а також можливість застосування наночастинок діоксиду церію (CeO_2) для корекції змін, що виникали в організмі щурів на тлі прийому ДСН. Церій відноситься до рідкоземельних металів групи лантаноїдів та існує у двох формах Ce^{2+} та Ce^{3+} , що обумовлює його участь в окисно-відновних реакціях. Наночастинки CeO_2 мають низьку токсичність та біологічну сумісність, є каталітично активними, що обумовлює перспективність використання цього наноматеріалу в біомедицині. Наночастинки CeO_2 були отримані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України.

У ході проведення нашої роботи на тлі перорального введення розчину ДСН щурам було індуковано розвиток хронічного виразкового коліту з подальшим проведенням корекції шляхом перорального введення 1 % розчину наночастинок CeO_2 протягом 14 діб в дозі 0,5 мл. В якості біоматеріалу обирали кров та препарати товстої кишки щурів, що увійшли до двох експериментальних груп та контрольної групи.

У клінічному аналізі крові щурів з модельованим колітом спостерігали лейкоцитоз зі збільшенням відсотку моноцитів у 3,16 разів у порівнянні з показниками інтактних тварин, що вказує на розвиток запального процесу в організмі щурів експериментальної групи. Після проведеної корекції спостерігалось суттєве зниження кількості лейкоцитів та відсотку моноцитів.

Розвиток оксидативного стресу у щурів з експериментальним хронічним колітом підтверджений підвищенням (на 68,8%) вмісту маркера ранньої пероксидації - 8-ізопростану у порівнянні з вмістом у крові інтактних тварин, що може свідчити на користь активації процесів вільно-радикального окислення. Після проведення корекції наночастинками діоксиду церію вміст 8-ізопростану знижувався на 24,7 %, але не досягав рівня показників контрольної групи. На тлі активації процесів ПОЛ спостерігали підвищення активності таких ензимів антиоксидантної системи, як каталаза (на 95,1 %) та супероксиддисмутаза (на 46,47 %) в крові тварин експериментальної групи у відповідь на дію вільних радикалів як компенсаторну реакцію організму. Після проведеної корекції активність компонентів ензиматичної ланки знижувалась на 22 %, але не досягала значень, отриманих у інтактних тварин, що свідчить про зниження інтенсивності процесів вільнорадикального окислення на тлі перорального прийому наночастинок діоксиду церію.

Дослідження генерації АФК лейкоцитами крові щурів з індукованим хронічним колітом показало підвищення СІФС ДХФС на 38,5 % в життєздатних лейкоцитах, що свідчить про інтенсифікацію процесів. Після застосування наночастинок діоксиду церію СІФС ДХФС знижувалася на 33,05 %, що майже відповідало показникам, що були отримані в контрольній групі щурів. Визначені нами показники СІФС ДХФС у популяції життєздатних гранулоцитів збільшувалися в експериментальній групі на 46,0 % відносно референтних значень та знижувалися на 13,2 % після проведення корекції, але не досягали показників, отриманих в групі контролю. Отримані нами дані вказують на те, що наночастинок діоксиду церію мали більший вплив саме на моноцити крові щурів з експериментальним колітом.

На нашу думку інтенсифікація процесів генерації АФК лейкоцитами призводить до активізації процесів клітинної загибелі, зокрема процесів апоптозу та некрозу. У крові щурів з експериментальним хронічним колітом спостерігалось зменшення у відсотковому відношенні в 1,46 рази життєздатних клітин та збільшення в 38,6 разів ранньоапоптотичних клітин, в 5 разів відсотку

пізньоапоптотичних та в 3,56 – відсотку некротичних клітин. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію відмічалось збільшення відсотку життєздатних клітин в 1,25 рази, зменшення відсотку ранньоапоптотичних клітин в 1,95 рази, пізньоапоптотичних – в 1,98 рази, некротичних – у 2,28 рази (рівень некротичних клітин після корекції відповідав рівню, що виявили у крові інтактних тварин).

Дослідження вмісту про- та протизапальних цитокінів в крові щурів з експериментальним хронічним колітом показало наявність дисбалансу про- та протизапальних цитокінів: в експериментальній групі прозапальні цитокіни IL-1 β та TNF- α підвищувались на 142,3 % та 90,9 % відповідно та знижувались після корекції на 35,6 % та 44,93 % у порівнянні до корекції, але не сягали рівня показників інтактних тварин. Вміст протизапального цитокіну IL-10 у тварин з експериментальним колітом підвищувався в 2,22 рази та лишався майже на тому ж рівні після проведеної корекції наночастинками, що може свідчити про компенсаторне залучення даного інтерлейкіну та стимуляцію розвитку репаративних процесів в організмі щурів.

Вміст моноцитарно-хемокінового протеїну-1, що вказує на активізацію хемотаксису моноцитів у зону запалення, підвищувався в сироватці крові щурів експериментальних груп на 27,5% у порівнянні з показником у щурів контрольної групи та знижувався після корекції наночастинками на 14,71% у порівнянні зі значенням, отриманим до корекції. Дослідження вмісту серпіну A4 (калістатину) показало підвищення вмісту в 2,73 рази у порівнянні з контролем та зниження в 2,55 рази у порівнянні показником до корекції, що сприяє зниженню кровотечі через зниження фібринолізу.

Розвиток оксидативного стресу впливає на структурно-функціональний стан мембран клітин. Дослідження змін фізико-хімічного складу цитоплазматичних мембран лейкоцитів щурів в наслідок активізації процесів ПОЛ з використанням флуоресцентних зондів показало підвищення співвідношення інтенсивності флуоресценції при використанні зонду O1O, що

визначається в ділянці гліцеринових голівок ФЛ, біля карбонільних головок груп ФЛ та жирнокислотних ланцюжків ФЛ поряд з карбонільними групами, на 41,0 % у порівнянні з показником у щурів контрольної групи. Після корекції наночастинками діоксиду церію співвідношення інтенсивності флуоресценції знижувалось на 10,2 % у порівнянні з показником до корекції, але лишався на 26,7 % вище ніж у групі контролю, що вказує на більш значну дегідратацію мембран лейкоцитів щурів у зоні карбонільних груп фосфоліпідів та в області вуглеводних ланцюгів фосфоліпідів поблизу полярної області бішару. Дегідратація вказує на зменшення плинності мембран лейкоцитів через посилення процесів перекисного окислення ліпідів в організмі щурів з експериментальним колітом.

Морфологічне дослідження мікропрепаратів товстої кишки щурів з експериментальним колітом свідчило про наявність характерних для хронічного коліту морфологічних змін: зменшення кількості келихоподібних клітин, інфільтрації макрофагами та моноцитами у власній пластинці при забарвленні гематоксилін-еозином; зміна характеру інфільтрату (зміна щільності, складу та розподілу клітин); дифузна поліморфноядерна інфільтрація СО, наявність ділянок ішемії в СО, нерівномірні вогнища зі зниженою проліферацією. Імуногістохімічне дослідження мікропрепаратів кишки виявило достовірне збільшення експресії білка Ki-67 більше ніж у 2 рази ($p < 0,05$) в СО товстої кишки щурів експериментальної групи з хімічно індукованим хронічним колітом, що свідчить про активізацію проліферативних процесів в організмі щурів з модельованим DSS-колітом. За умов проїедення дослідження характеру інфільтрату СО кишки щурів шляхом визначення експресії маркерів Т-лімфоцитів (CD3) та макрофагів (CD68) за допомогою ІГХ методу було визначено, що абсолютна кількість CD3⁺ клітин у власній пластинці у тварин з експериментальним колітом була більша, ніж у інтактних. Кількість CD68⁺ клітин була майже у 2 рази більша, ніж у тварин контрольної групи. Більшість CD3- та CD68-позитивних клітин скупчувалась у зонах порушення епітеліального бар'єру, що може свідчити про залучення мікробного компоненту

до патогенезу хронічного коліту, індукованого пероральним введенням DSS. В результаті проведеної корекції наночастинками діоксиду церію відмічали зменшення інфільтрації СО CD3⁺ та CD68⁺ клітинами, а також зменшення експресії білка Ki-67 у порівнянні з показником ІГХ дослідження до корекції.

Отримані у результаті експериментального дослідження зміни у клінічному аналізі крові та співвідношення вмісту про- та протизапальних цитокінів, морфологічні дослідження вказують на розвиток запального процесу, активацію процесів перекисного окислення ліпідів (підвищення вмісту 8-ізопростану як раннього маркера ліпопероксидації), зміни фізико-хімічних властивостей мембран лейкоцитів, збільшення інтенсивності генерації АФК, активацію процесів апоптозу та некрозу дозволяють розробити схему механізмів розвитку експериментального хронічного коліту у щурів і схему змін в організмі щурів з експериментальним колітом на тлі проведення корекції наночастинками діоксиду церію. За результатами власних досліджень були розроблені схеми патогенезу та корекції експериментального хронічного коліту у щурів (рис. 6.1, 6.2).

Підвищення генерації АФК в лейкоцитах призводить до розвитку оксидативного стресу і активації процесів перекисного окислення ліпідів, що підтверджується підвищенням вмісту маркера ранньої ліпопероксидації – 8-ізопростану. В результаті активізації ВРП відбуваються зміни фосфоліпідного стану мембран клітин, зокрема лейкоцитів. На тлі вказаних змін відбувається активізація процесів апоптозу – запрограмованої клітинної загибелі, що відбувається в організмі як за нормальних умов, так і в разі розвитку патологічних процесів, зокрема запалення та дії токсичних агентів. Як відомо, розвиток запальних процесів у кишечнику супроводжується зміною проникності СО і як результат збільшується надходження люмінальних антигенів до кровотоку, що зумовлює міграцію імунокомпетентних клітин до осередка запалення. В той самий час у СО відбуваються проліферативні процеси в разі переходу захворювання в стадію ремісії внаслідок проведеної терапії чи компенсаторних можливостей організму.

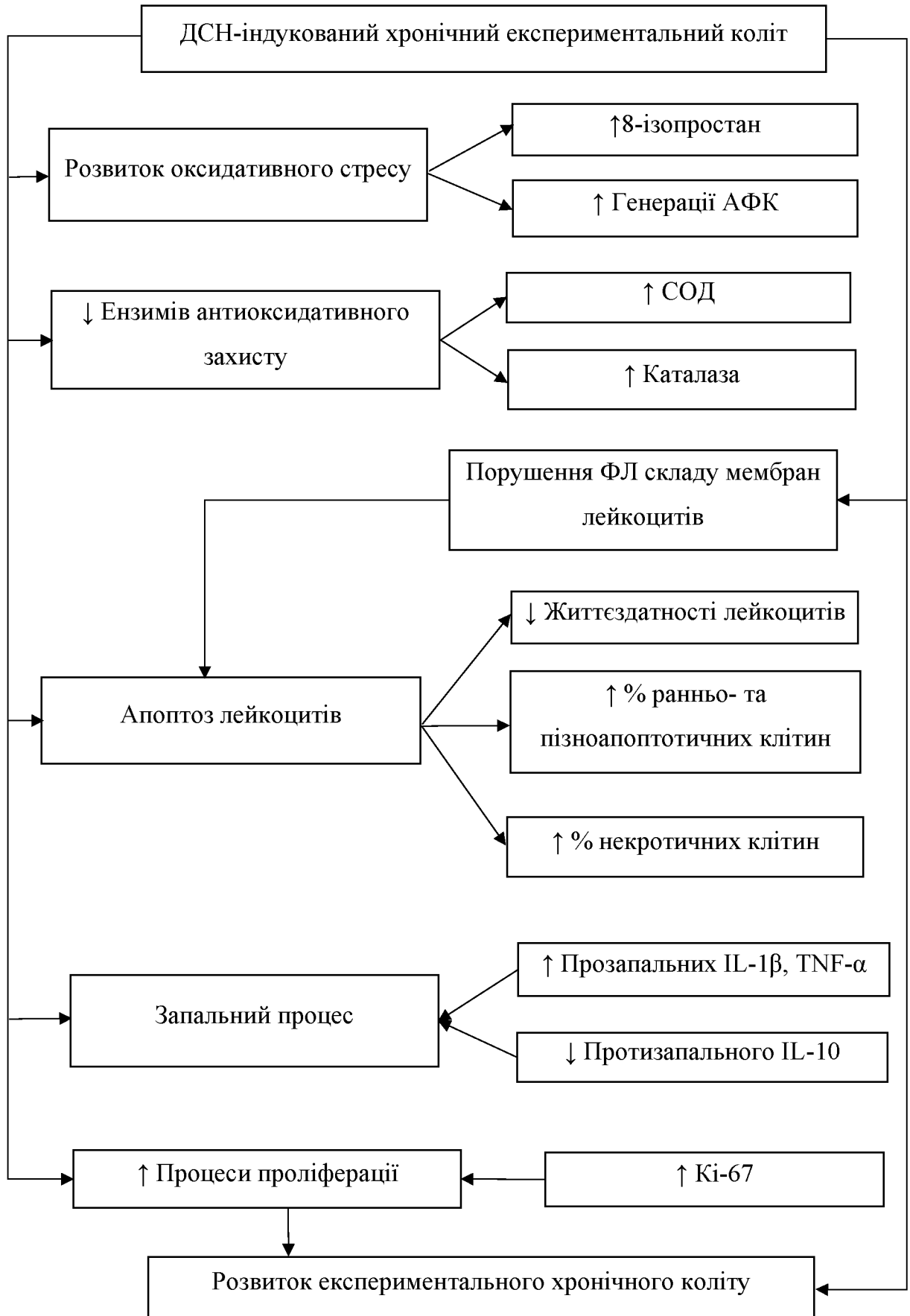


Рисунок 6.1. Схема розвитку експериментального хронічного коліту у щурів.

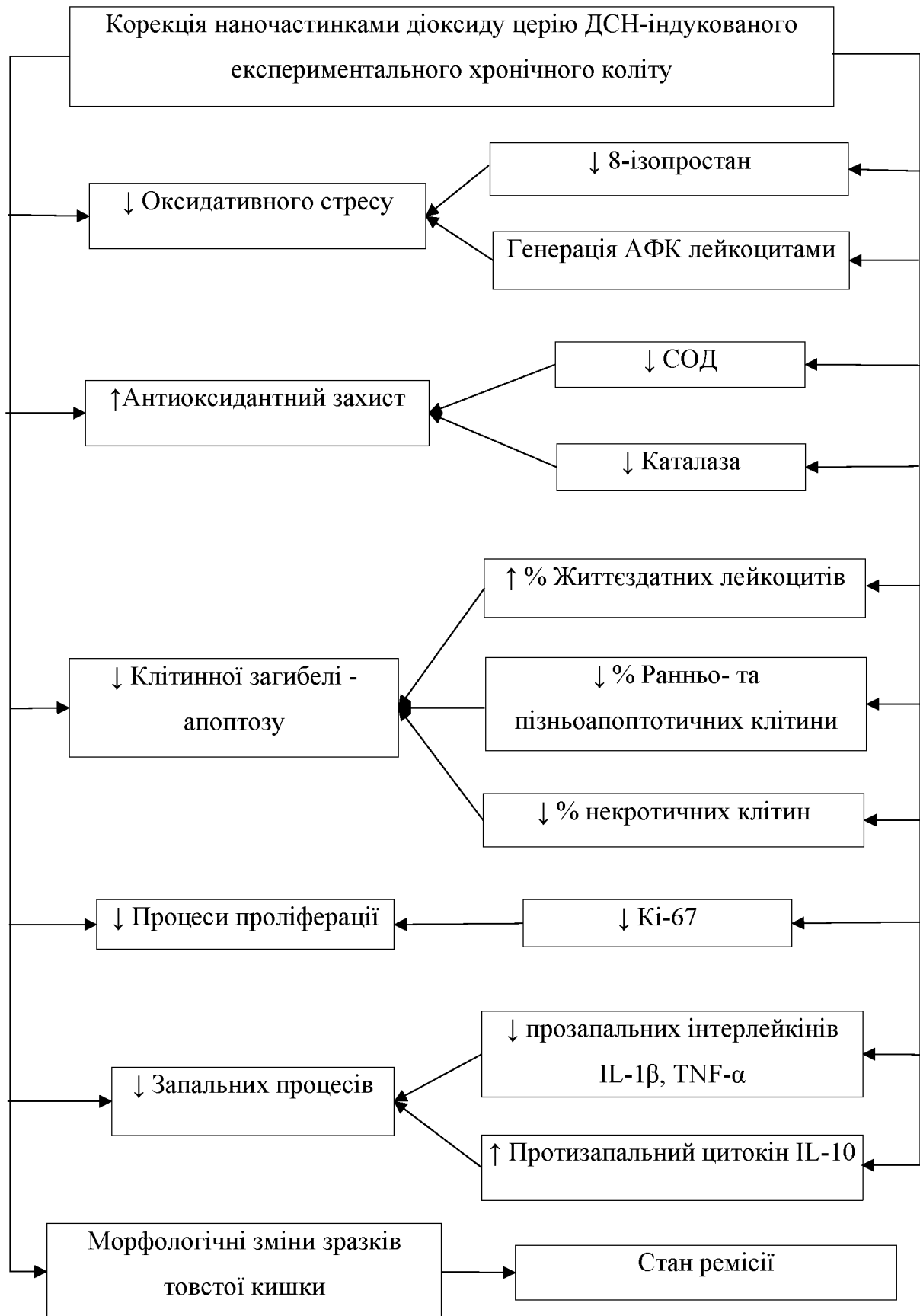


Рисунок 6.2. Схема експериментального хронічного коліту після корекції наночастинками діоксиду церію.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі надано теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання сучасної медичної біохімії, що полягає у вивченні ролі апоптозу лейкоцитів периферичної крові і процесів проліферації в слизовій оболонці товстої кишки у біохімічних механізмах розвитку експериментального коліту і обґрунтуванні можливості застосування наночастинок діоксиду церію для корекції патологічних змін слизової оболонки за умов експериментального ДСН-індукованого хронічного коліту у щурів.

1. У експериментальних тварин з ДСН-індукованим хронічним колітом вміст інформаційного маркера раннього оксидативного стресу – 8-ізопростану в сироватці крові достовірно підвищувався на 68,6 % у порівнянні з показником у щурів контрольної групи, що свідчило про підвищення процесів ліпідної пероксидації. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію вміст 8-ізопростану знижувався на 24,7% від показників до корекції. В крові щурів спостерігалось значне підвищення активності компонентів ензиматичної ланки антиоксидантного захисту: супероксиддисмутази - на 46,47 %, а каталази – на 95,1 % відповідно у порівнянні з інтактними тваринами. Після перорального введення наночастинок діоксиду церію показники антиоксидантного захисту знижувалися: супероксиддисмутази та каталази на 22 % у порівнянні з показниками у контрольній групі.

2. У щурів з експериментальним хронічним колітом спостерігалось збільшення генерації АФК, розвиток оксидативного стресу з подальшим впливом на структурно-функціональний стан клітин, зокрема імунних. Інтенсивність генерації АФК у загальній популяції лейкоцитів щурів з хімічно індукованим колітом зросла на 38,5 % у порівнянні з контрольною групою. Після проведеної корекції генерація АФК у лейкоцитах знижувалась на 33,05 % у порівнянні з показниками до корекції наночастинками діоксиду церію. Генерація АФК у гранулоцитах крові щурів з хронічним ДСН-колітом підвищувалась на 46,0 % у порівнянні з показниками у інтактних тварин. Після корекції генерація

АФК в гранулоцитах знижувалась на 13,2 % у порівнянні з показником до проведення корекції. У тварин з експериментальним хронічним колітом відсоток життєздатних клітин зменшився в 1,46 рази ($p=0,022$), а відсоток апоптотичних клітин збільшився: ранньоапоптотичних клітин у 38,6 рази ($p=0,005$), пізньоапоптотичних – у 5 разів ($p=0,001$), некротичних – в 3,56 рази ($p=0,01$) у порівнянні з показниками у інтактних тварин. Після проведеної корекції наночастинками спостерігалось підвищення відсотку життєздатних клітин в 1,25 рази і зниження відсотку ранньоапоптотичних клітин в 1,95 рази та пізньоапоптотичних – в 1,98 рази у порівнянні з показниками у інтактних тварин. Відсоток некротичних клітин знижувався в 2,28 рази у порівнянні з показником до корекції та не вирізнявся за відсотком некротичних клітин у крові інтактних тварин.

3. Вміст у крові щурів з експериментальним колітом прозапальних інтерлейкінів, зокрема IL-1 β та TNF- α підвищувався на 142,3 % та 90,9 % відповідно, на тлі компенсаторного підвищення протизапального IL-10 в 2,22 рази у порівнянні з контрольною групою. Отримані результати вказують на наявність запального процесу в організмі щурів. Після проведеної корекції наночастинками діоксиду церію вміст прозапальних інтерлейкінів знижувався на 35,6 % для IL-1 β та 44,93 % для TNF- α у порівнянні з показниками до корекції. Вміст протизапального IL-10 не змінювався після корекції. Розраховані коефіцієнти K1 та K2 свідчили про більш значущий вплив IL-10 та TNF- α в патогенезі експериментального коліту.

4. Вміст моноцитарно-хемокінового протеїну-1 у крові щурів з експериментальним хронічним колітом підвищувався на 27,8 % ($p=0,0022$) у порівнянні з вмістом в крові щурів контрольної групи. Після корекції спостерігалось зниження MCP-1 на 14,71 % ($p=0,0022$) у порівнянні з показником до корекції, що свідчить про зниження спрямованої міграції імунних клітин до осередку запалення, а також зниження інтенсивності запальних процесів в організмі експериментальних тварин. Вміст серпіну A4 у сироватці крові щурів підвищувався в 2,73 рази у порівнянні з вмістом у сироватці щурів контрольної

групи. Після проведеної корекції спостерігалось збільшення вмісту в 2,55 рази у порівнянні з показником експериментальної групи до перорального введення наночастинок діоксиду церію. Зниження вмісту серпіну А4 в сироватці після корекції може знижувати фібриноліз, що буде знижувати кровотечу та інгібувати процеси апоптозу.

5. Дослідження стану фосфоліпідного бішару мембран лейкоцитів виявило, що у цитоплазматичних мембранах у регіонах локалізації флюоресцентних зондів О6О та РН7 змін не спостерігається, тоді як при використанні зонду О1О відмічалось збільшення співвідношення флюоресценції на 41,0 % у порівнянні з контрольною групою. Виявлено зміни фізико-хімічних властивостей фосфоліпідного бішару в зоні карбонільних груп фосфоліпідів та поблизу полярної області бішару, що може свідчити про посилення процесів перекисного окислення ліпідів за умов хронічного експериментального коліту.

6. Проведене морфологічне дослідження зразків товстої кишки щурів з експериментальним колітом свідчить про: пошкодження епітеліального бар'єру, прискорену клітинну регенерацію поверхневого епітелію, збільшення клітинного інфільтрату з поширенням його на всю слизову оболонку та ознаки запалення - збільшення вмісту лімфоїдних сукупчень та фолікулів, дифузна поліморфноядерна інфільтрація, вогнищева ішемія слизової оболонки товстої кишки, що підтверджує розвиток хронічного коліту на тлі перорального введення тваринам розчину ДСН. Результати імуногістохімічних досліджень підтверджують формування коліту. Дослідження експресії маркера проліферації – білка Кі67 виявило достовірне збільшення експресії більше ніж удвічі ($p < 0,05$) в групі експериментальних тварин. Показано сильну негативну кореляцію між експресією Кі67 та ішемією ($r = -0,819$). Отримані дані свідчать про залучення мікробного компоненту до розвитку експериментального хронічного коліту, так як більшість CD3- та CD68-позитивних клітин сукупчуються в зонах пошкодження епітеліального бар'єру. Декстрансульфат натрію сприяє розвитку запального процесу через порушення складу мікробіоти кишківника.

7. Проведено комплексне біохімічне та морфологічне дослідження щурів з експериментальним хронічним колітом. Визначено роль процесів апоптозу лейкоцитів і проліферації в біохімічних механізмах розвитку хімічно індукованого коліту. Біохімічно і морфологічно обґрунтовано застосування наночастинок діоксиду церію для проведення корекції дисбалансу оксидантно-антиоксидантної системи, клітинної загибелі лейкоцитів, запальних та проліферативних процесів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bruner, L.P.; White, A.M.; Proksell, S. (2023). Inflammatory bowel disease. *Primary care*, 50 (30): 411-427. Doi: 10.1016/j.pop.2023.03.009.
2. Flynn, S.; Eisenstein, S. (2019). Inflammatory bowel disease Presentation and diagnosis. *The surgical clinics of North America*, 99 (6): 1051-1062. Doi: 10.1016/j.suc.2019.08.001.
3. Kelsen, J.R.; Russo, P.; Sullivan, E. (2019). Early-onset inflammatory bowel disease. *Immunology and allergy clinics of North America*, 39 (1): 63-79. Doi: 10.1016/j.iac.2018.08.008.
4. Seyedian, S., S.; Nokhostin, F.; Malamir, M.D. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of medicine and life*, 12 (2): 113-122. Doi: 10.25122/jml-2018-0075.
5. Singh, N.; Bernstein, C.N. (2022). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *United European gastroenterology journal*, 10 (10): 1047–1053. Doi: 10.1002/ueg2.12319.
6. Saez, A.; Herrero-Fernandez, B.; Gomez-Bris, R.; Sánchez-Martinez, H.; Gonzalez-Granado, J.M. (2023). Pathophysiology of inflammatory bowel disease: Innate immune system. *International journal of molecular sciences*, 24 (2): 1526. Doi: 10.3390/ijms24021526.
7. Wu, C.; Yang, H.; Han, C., et al. (2021). Quyu Shengxin Decoction Alleviates DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice by Suppressing RIP1/RIP3/NLRP3 Signalling. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021:14. doi.org/10.1155/2021/6682233
8. Bai X, Gou X, Cai P, et al. (2019). Sesamin Enhances Nrf2-Mediated Protective Defense against Oxidative Stress and Inflammation in Colitis via AKT and ERK Activation. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 20. doi: 10.1155/2019/2432416.
9. Torres, J.; Mehandru, S.; Colombel, J.-F.; Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet*, 389 (10080): 1741-1755. Doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.

10. Petanga, L.; Ganini, C.; Bellato, V.; Campanelli, M.; Divisia, A.; Efrati, C. et al. (2020). Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. *Biology direct*, 15 (1): 23. Doi: 10.1186/s13062-020-00280-5.

11. Srinivasan, A.R. (2024). Treat to target Crohn's disease: A practical guide for clinicians. *World journal of gastroenterology*, 30 (1): 50-69. Doi: 10.3748/wjg.v30.i1.50.

12. Honap, S.; Maede, S.; Spenser, A.; Pavlidis, P.; Lubber, R.P. et al. (2022). Anogenital Crohn's disease and granulomatosis: a systematic review of epidemiology, clinical manifestation, and treatment. *Journal of Crohn's & colitis*, 16(5): 822-834. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjab211.

13. Wu, Z.-C.; Zhao, Z.-L.; Deng, J.-P., et al. (2020). Sanhuang Shu'ai decoction alleviates DSS-induced ulcerative colitis via regulation of gut microbiota, inflammatory mediators and cytokines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 125:109934. doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109934.

14. Bilsborough, J.; Fiorino, M. F.; Henkle, B.W. (2020). Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis. *Expert opinion on drug discovery*, 16 (5): 567-577. Doi: 10.1080/17460441.2021.1851185.

15. Jin, Z.; Liu, Z.; Pan, J.; Wang, S.; Cui, M.; He, C. et al. (2024). FGF20 modulates gut microbiota to migrate dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mouse models. *International immunopharmacology*, 142 (Pt A): 113044. Doi: 10.1016/j.intimp.2024.113044.

16. Yang, C.; Merlin, D. (2024). Ulcerative colitis: a journey through the dextran sodium sulfate-induced model. *Inflammatory bowel diseases*, 30 (5): 844-853. Doi: 10.1093/ibd/izad312.

17. Mohan, L.J.; Daly, J.S.; Ryan, B.M.; Ramtoola, Z. (2019). The future of nanomedicine in optimising the treatment of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 54 (1): 18-26. Doi: 10.1080/00365521.2018.1563805.

18. Khare, T.; Palakurthi, S.S.; Shah, B.M., et al. (2020). Natural product-based nanomedicine in treatment of inflammatory bowel disease. *International journal of molecular science*, 21 (11): 3956. Doi: 10.3390/ijms21223956.
19. Giron, A.; Pasto, A.; Tasciotti, E.; Abraham, B.P. (2019). Nanotechnology in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel disease*, 25 (12): 1871-1880. Doi: 10.1093/ibd/izz205.
20. Liu, S.; Xia, Y.; Ji, F. (2023). Advances in macrophage-targeting nanoparticles for the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Zhejiang University Medical sciences*, 52 (6): 785-794. Doi: 103724/zdxbyxb-2023-0289.
21. Li, Q.; Lin, L.; Zhang, C.; Zhang, H.; Ma, Y.; Qian, H.; Chen, X.-L.; Wang, X. (2024). The progression of inorganic nanoparticles and natural products for inflammatory bowel disease. *Nanobiotechnology*, 22 (1): 17. Doi: 10.1186/s12951-023-02246-x.
22. Huang, Y.; Xu, J.; Sun, G.; Cheng, X.; An, Y.; Yao, X.; Nie, G.; Zhang, Y. (2025). *Biomaterials*, 314:122822. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2024.122822.
23. Mi, L.; Zhang, K.; Ma, J.-X.; Yao, J.-F.; Tong, Y.-L.; Bao, Z.-J. (2025). Hollow cerium nanoparticles synthesized by one-step method for multi-enzyme activity to reduce colitis in mice. *World journal of gastroenterology*, 31 (5): 98732. Doi: 10.3748/wjg.v31.i5.98732.
24. Massuger, W.; Moore, G.T.C.; Andrews, J.M.; Kilkenny, M.F. et al. (2019). Crohn's & Colitis Australia inflammatory bowel disease audit: measuring the quality of care in Australia. *International medicine journal*, 49 (7): 859-866. Doi: 10.1111/imj.14187.
25. Day, A.S.; Lemberg, D.A. (2020). Identification and diagnosis of Crohn disease and ulcerative colitis in children. *Journal of paediatrics and child health*, 56 (11): 1731-1734. Doi: 10.1111/jpc.14925.
26. Lee, J.W.; Eun, C.S. (2022). Inflammatory bowel disease in Korea: epidemiology and pathophysiology. *The Korean journal of internal medicine*, 37 (5): 885-894. Doi: 10.3904/kjim.2022.138.

27. M'Koma, A.E. (2022). Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview. *Medicina*, 58 (5): 567. Doi: 10.3390/medicina58050567.
28. Gordon, H.; Biancone, L.; Fiorino, G. et al. (2023). ECCO Guidelines on Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. *Journal of Crohn's and colitis*, 17 (6): 827-854. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjac187.
29. Veauthier, B.; Hornecker, J.R. (2018). Crohn's disease: diagnosis and management. *American family physician*, 98 (11): 661-669. PMID: 30485038.
30. Gajendran, M.; Loganathan, P.; Catinella, A.P. (2018). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-month*, 64 (2): 20-57. Doi: 10.1016/j.disamonth.2017.07.001.
31. Srinivasan, A.R. (2024). Treat to target in Crohn's disease: A practical guide for clinicians. *World journal of gastroenterology*, 30 (1): 50-69. Doi: 10.3748/wjg.v30.i1.50.
32. Voelker, R. (2024). What is ulcerative colitis? *JAMA*, 331 (8): 716. Doi: 10.1001/jama.2023.23814.
33. Wangchuk, P.; Yeshi, K.; Loukas, A. (2024). Ulcerative colitis: clinical biomarkers, therapeutic targets, and emerging treatments. *Trends in pharmacological sciences*, 45 (10): 892-903. Doi: 10.1016/j.tips.2024.08.003.
34. Segal, J.P.; LeBlank, J.-F.; Hart, A.L. (2021). Ulcerative colitis: an update. *Clinical medicine*, 21 (2): 135-139. Doi: 10.7861/clinmed.2021-0080.
35. Ordas, I.; Eckman, L.; Baumgart, D.C. (2012). 380 (9853): 1606-19. Doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
36. Du, L.; Ha, C. (2020). Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. *Gastroenterology clinics of North America*, 49 (4): 643-654. Doi: 10.1016/j.gtc.2020.07.005.
37. Turnen, D.; Ruemmele, F.M.; Orlanski-Meyer, E. (2018). Management of paediatric ulcerative colitis, Part 1: Ambulatory care - an evidence-based guideline from European Crohn's and colitis organization and European society of paediatric

gastroenterology, hepatology and nutrition. *Journal of paediatric gastroenterology and nutrition*, 67 (2): 257-291. Doi: 10.1097/MPG.0000000000002035.

38. Huang, H.; Ma, J.; Guo, T. et al. (2025). Investigating the molecular mechanisms associated with ulcerative colitis through the application of single-cell combined spatial transcriptome sequencing. *Frontiers in immunology*, 13:16:1534768. Doi: 10.3389/fimmu.2025.1534768.

39. Saez, A.; Gomez-Bris, R.; Herrero-Fernandez, B. et al. (2021). Innate lymphoid cells in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *International journal of molecular sciences*, 22 (14): 7618. Doi: 10.3390/ijms22147618.

40. Singh, N.; Bernstein, C.N. (2022). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *United European gastroenterology journal*, 10 (10): 1047-1053. Doi: 10.1002/ueg2.12319.

41. Paramsothy, S.; Nielsen, S.; Kamm, M.A. et al. (2018). Specific bacteria and metabolites associated with response to fecal microbiota transplantation in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 156 (5): 1440-1454.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.001.

42. Wu, M.; Liu, D.; Xiong, X., et al. (2025). Analysis of the molecular mechanisms of ulcerative colitis and atherosclerosis by microarray data. *Scientific reports*, 15 (1): 10715. Doi: 10.1038/s41598-025-95125-4.

43. Tsujii, Y.; Nishida, T.; Osugi, N., et al. (2021). Classification and clinical features of adverse drug reactions in patients with ulcerative colitis treated with 5-aminosalicylate acid: a single-center, observational study. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 57 (2): 190-196. Doi: 10.1080/00365521.2021.1998601.

44. Lai, L.; Li, H.; Shen, J., et al. (2021). Multi-factor mediated functional modules identify novel classification of ulcerative colitis and functional gene panel. *Scientific reports*, 11 (1): 5669. Doi: 10.1038/s41598-021-85000-3.

45. Kobayashi, T.; Siegmund, B.; Le Berre, C., et. Al. (2020). Ulcerative colitis. *Nature reviews. Disease primers*, 6 (1): 74. Doi: 10.1038/s41572-020-0205-x.

46. Porter, R.J.; Kalla, R.; Ho, G.-T. (2020). Ulcerative colitis: recent advances in the understanding of disease pathogenesis. *F1000Research*, 29:9: F1000 Faculty Rev-294. Doi: 10.12688/f1000research.20805.1.
47. Uo, M.; Hisamatsu, T.; Miyoshi, J., et al. (2013). Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through FcγR-mediated CD14 macrophage activation. *Gut*, 62 (12): 1734-44. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-303063.
48. Agraval, H.; Gupta, N. (2025). Comparative analysis of the pathogenesis in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*, 31 (29): 109892. Doi: 10.3748/wjg.v31.i29.109892.
49. Lin, X.H.; Wang, H.C.; Li, Y.Y., et al. (2019). IgG plasma cells initiate changes in the protein C system in mouse ulcerative colitis through CD14+CD64+ macrophage activation. *Advances in clinical and experimental medicine*, 28 (8): 1101-1110. Doi: 10.17219/acem/94160.
50. ElMahdi, M.Kh.; Antar, S.A.; Elamhallawy, E.K. (2021). A novel role of dapagliflozin in mitigation of acetic acid-induced ulcerative colitis by modulation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)/nuclear factor-Kappa B (NF-κB)/interleukin-18 (IL-18). *Biomedicines*, 10(1): 40. Doi: 10.3390/biomedicines10010040.
51. Ding, H.; Liu, X.-C.; Jian-Ming, X., et al. (2021). Identification of crucial genes and related transcription factors in ulcerative colitis. *Annals of clinical and laboratory science*, 51 (2): 245-254. PMID: 33941565.
52. Ng, C.N.; Shi, H.Y.; Hamidi, N.; Underwood, F.E., et al. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390 (10114): 2769-2778. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
53. Naser, S.A.; Arce, M.; Fernandez, M., et al. (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 18(5): 412-24. Doi: 10.3748/wjg.v18.i5.412.

54. Li, Y.; Yan, F.; Wang, W., et al. (2024). Identification and experimental validation of immune-related gene PPARG is involved in ulcerative colitis. *Biochimica et Biophysica acta*, 1870 (7): 167300. Doi: 10.1016/j.bbadis.2024.167300.
55. Lamb, Ch.; Kennedy, N.A.; Raine, T., et al. (2019). British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 68 (Suppl 3): s1-s106. Doi: 10.1136/gutjnl-2019-318484.
56. Wang, Sh.; Shen, L.; Luo, H. (2021). Identification and validation of key miRNAs and a microRNA-mRNA regulatory network associated with ulcerative colitis. *DNA and cell biology*, 40 (2): 147-156. Doi: 10.1089/dna.2020.6151.
57. Giammona, A.; Galuzzi, B.G.; Imperia, E., et al. (2025). Chronic Gastrointestinal Disorders and miRNA-Associated Disease: An Up-to-Date. *International journal of molecular sciences*, 26 (1): 423. Doi: 10.3390/ijms26010413.
58. DeSantis, A.H.; Buss, K.; Coker, K.M., et al. (2025). Multiomics-Based Profiling of the Fecal Microbiome Reveals Potential Disease-Specific Signatures in Pediatric IBD (PIBD). *Biomolecules*, 15 (5): 746. Doi: 10.3390/biom15050746.
59. Katsandegwaza, B.; Horsnell, W.; Smith, K., et al. (2022). Inflammatory Bowel Disease: A Review of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease. *International journal of molecular sciences*, 23 (16): 9344. Doi: 10.3390/ijms23169344.
60. Wen, C.; Chen, D.; Zhong, R., et al. (2024). Animal models of inflammatory bowel disease: category and evaluation indexes. *Gastroenterology report*, 10:3:773953. Doi: 10.3389/ftox.2021.773953.
61. Pedersen, G. (2015). Development, validation and implementation of an *in vitro* model for the study of metabolic and immune function in normal and inflamed human colonic epithelium. *Danish medical journal*, 62 (1): B4973. PMID: 25557335.
62. Karnele, E.P.; Moldoveanu, A.L.; Kaymak, I., et al. (2023). Single cell RNA-sequencing profiling to improve the translation between human IBD and *in vivo* models. *Frontiers in immunology*, 19:14:1291990. doi: 10.3389/fimmu.2023.1291990.

63. Gadaleta, R.M.; Garcia-Irigoyen, O.; Moschetta, A. (2017). Exploration of inflammatory bowel disease in mice: chemically induced murine models of inflammatory bowel disease (IBD). *Current protocols in mouse biology*, 7 (1): 13-28. Doi: 10.1002/cpmo.20.

64. Rajamäki, K.; Taira, A.; Katainen, R., et al. (2021). Genetic and epigenetic characteristics of inflammatory bowel disease – associated colorectal cancer. *Gastroenterology*, 161(2): 592-607. Doi: 10.1053/j.gastro.2021.04.042.

65. Muller, M.; Hansmann, F.; Arnone, D., et al. (2020). Genomic and molecular alteration in human inflammatory bowel disease-associated cancer. *United European gastroenterology journal*, 8 (6): 675-684. Doi:10.1177/2050640620919254.

66. Karaca, T.; Uz, Y.H.; Demitras, S., et al. (2015). Protective effects of royal jelly in 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(4): 370-9. PMID: PMC4439452.

67. Guo, J.; Shang, X.; Chen, P., et al. (2023). How does carrageenan cause colitis? A review. *Carbohydrate polymers*, 15:302:120374. Doi: 10.1016/j.carbpol.2022.120374.

68. Shang, Q.; Sun, W.; Sgan, X., et al. (2017). Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicology letters*, 5:279:87-95. Doi: 10.1016/j.toxlet.2017.07.904.

69. Naggar, E.E.; Mohamed, E.A.; Borg, T.M., et al. (2020). Colon targeting of naringin for enhanced cytoprotection against indomethacin-induced colitis in rabbits. *Drug design, development and therapy*, 19:14:677-696.

70. Jia, B.; Zhao, L.; Liu, P., et al. (2023). Limonin ameliorates indomethacin-induced intestinal damage and ulcers through Nrf2/ARE pathway. *Immunity, inflammation and disease*, 11(2): e787. Doi: 10.1002/iid3.787.

71. Wen, C.; Chen, D.; Zhong, R., et al. (2024). Animal models of inflammatory bowel disease: category and evaluation indexes. *Gastroenterol report*, 16:12:goae021. Doi: 10.1093/gastro/goae021.

72. Eichele, D.D.; Kharbanda, K.K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 30 (5): 844-853. Doi: 10.1093/ibd/izad312.

73. Gonzalez-Acera, M.; Patankar, J.V.; Erkert, L., et al. (2025). Integrated multimodel analysis of intestinal inflammation exposes key molecular features of preclinical and clinical IBD. *Gut*, 29:gutjnl-2024-333729. Doi: 10.1136/gutjnl-2024-333729.

74. Chen, K.; Shang, S.; Yu, S. (2022). Identification and exploration of pharmacological pyroptosis-related biomarkers of ulcerative colitis. *Frontiers in immunology*, 13:13:998470. Doi: 10.3389/fimmu.2022.998470.

75. Catana, C.S.; Magdas, C.; Tabaran, F.A. (2018). Comparison of two models of inflammatory bowel disease in rats. *Advances in clinical and experimental medicine*, 27 (5): 599-607. Doi: 10.17219/acem/69.134.

76. Horn, M.E.; Segner, H.; Brinkmann, S. (2022). Chemically-induced trout model of acute intestinal inflammation using TNBS. *Fish and shellfish immunology reports*, 29:4:100073. Doi: 10.1016/j.fsirep.2022.100073.

77. Huang, Y.; Su, Y.; Qin, R., et al. (2023). Mechanism by which oleracein E alleviates TNBS-induced ulcerative colitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 35 (8): 854-864. Doi: 10.1097/MEG.0000000000002597.

78. Zhao, Z.-X.; Yuan, X.; Cui, Y.-Y., et al. (2022). Melatonin mitigates oxazolone-induced colitis in microbiota-dependent manner. *Frontiers in immunology*, 18:12:783806. Doi: 10.3389/fimmu.2021.7880.

79. Cisek, A.A.; Szymanska, E., et al. (2024). The role of methanogenic archaea in inflammatory bowel disease-a review. *Journal of personalized medicine*, 14 (2): 196. Doi: 10.3390/jpm14020196.

80. Askari, H.; Shojaei-Zarghani, S., et al. (2023). The role of gut microbiota in inflammatory bowel disease-current state of the art. *Mini review in medicinal chemistry*, 23 (13): 1376-1389. Doi: 1376-1389.

81. Czajkowska, A.; Guzinska-Ustimowicz, K.; Poczynicz, A., et al. (2022). Are matrix metalloproteinase-9 and Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 useful as markers in diagnostic management of children with N\newly diagnosed ulcerative colitis? *Journal of clinical medicine*, 11 (9): 2655. Doi: 10.3390/jcm11092655.
82. Shen, Bo; Abreu, M.T.; Cohen, E.R., et al. (2025). Endoscopic diagnosis and management of adult inflammatory bowel disease: a consensus document from the American Society for Gastrointestinal Endoscopy IBD Endoscopy Consensus Panel. *Gastrointestinal endoscopy*, 101 (2): 295-314. Doi: 10.1016/j.gie.2024.08.034.
83. Lee, D.S.; Lee, K.L.; Jeong, J.B., et al. (2021). Expression of chemokine CCL28 in ulcerative colitis patients. *Gut and liver*, 15 (1): 70-76. Doi: 10.5009/gnl19273.
84. Kaenkumchorn, T.; Wahbeh, G. (2020). Ulcerative colitis: making the diagnosis. *Gastroenterology clinics of North America*, 49 (40): 655-669. Doi: 10.1016/j.gtc.2020.07.001.
85. Burri, E.; Maillard, M.H.; Schoepfer, A.M., et al. (2020). Treatment algorithm for mild and moderate-to-severe ulcerative colitis: an update. *Digestion*, Suppl 1: 2-15. Doi: 10.1159/000504092.
86. Jackson, P.; De Cruz, P. (2018). Algorithms to facilitate shared decision-making for the management of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 12 (11): 1079-1100. Doi: 10.1080/17474124.2018.1530109.
87. Salice, M.; Rizzello, F.; Calabrese, C., et al. (2019). A current overview of corticosteroid use in active ulcerative colitis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 13 (6): 557-561. Doi: 10.1080/17474124.2019.1604219.
88. Pabla, B.S.; Schwarz, D.A. (2020). Assessing Severity of Disease in Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology clinics of North America*, 49 (4): 671-688. Doi: 10.1016/j.gtc.2020.08.003.
89. Li, R.; Yang, L. (2025). Research progress in the combined treatment of ulcerative colitis. *Revista espanola de enfermedades de gestivas*, 117 (3): 129-135. Doi: 10/17235/reed2023.9444/2022.

90. Salice, M.; Rizzello, F.; Calabrese, C., et al. (2019). Budesonide MMX: efficacy and safety profile in the treatment of ulcerative colitis. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 13 (7): 607-613. Doi: 10.1080/17474124.2019.1621745.
91. Chu, X.; Biao, Y.; Liu, C., et al. (2023). Network meta-analysis on efficacy and safety of different biologics for ulcerative colitis. *BMC gastroenterology*, 23 (1): 346. Doi: 10.1186/s12876-023-02938-6.
92. Gilmore, R.; Tan, W.L.; Fernandes, R., et al. Upadacitinib salvage therapy for infliximab-experienced patients with acute severe ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and colitis*, 17 (12): 2033-2036. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjad115.
93. Hanzel, J.; Bossuyt, P.; Pittet, V., et al. (2023). Development of a Core Outcome Set for Real-world Data in Inflammatory Bowel Disease: A European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] Position Paper. *Journal of Crohn's and colitis*, 17 (3): 311-317. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjac136.
94. Di Ruscio, M.; Variola, A.; Vernia, F., et al. (2021). Role of ulcerative colitis endoscopic index of severity (UCEIS) versus mayo endoscopic subscore (MES) in predicting patients' response to biological therapy and the need for colectomy. *Digestion*, 102 (4): 534-545. Doi: 10.1159/000509512.
95. Keshteli, A.H.; Madsen, K.L.; Dieleman, L.A. (2019). Diet in the Pathogenesis and Management of Ulcerative Colitis; A Review of Randomized Controlled Dietary Interventions. *Nutrients*, 11 (7): 1498. Doi: 10.3390/nu11071498.
96. Barnes, A.; Spizzo, P.; Mountifield, R. (2022). Corticosteroid exposure prior to admission and predicting need for rescue therapy in acute severe ulcerative colitis. *Internal medicine journal*, 52 (5): 828-833. Doi: 10.1111/imj.15131.
97. Ochoa, B.; McMahon, L. (2024). Surgery for ulcerative colitis. *Seminars in pediatric surgery*, 33 (2): 151404. Doi: 10.1016/j.sempedsurg.2024.151404.
98. Nakase, H. (2023). Acute severe ulcerative colitis: optimal strategies for drug therapy. *Gut and liver*, 17 (1): 49-57. Doi: 10.5009/gnl220017.
99. Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice:

correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(6):1328-1338.

100. Perše M, Cerar A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: raps and Tricks. *Animal Models of Human Pathology.* 2012;2012.ID718617. doi.org/10.1155/2012/718617

101. Andrey N. Chibisov, Maxim A. Pugachevskii, Alexander P. Kuzmenko, Alexey I. Kartsev. (2022). Effect of morphology and size on the thermodynamic stability of cerium oxide nanoparticles: Experiment and molecular dynamics calculation, *Nanotechnology Reviews*, 11 (1) : 620-624. 10.1515/ntrev-2022-0038.

102. Nikitchenko YV, Klochkov VK, Kavok NS, Karpenko NA, Yefimova SL, Semynozhenko VP, Nikitchenko IV, Bozhkov AI. CeO₂ nanoparticles improve prooxidant/antioxidant balance, life quality and survival of old male rats. *Biogerontology.* 2023 Feb;24(1):47-66. doi: 10.1007/s10522-022-09987-6. Epub 2022 Aug 28. PMID: 36030453.

103. Nicusor Fifere, Anton Airinei, Mihai Asandulesa, Aurelian Rotaru, Elena Laura Ursu, Florica Doroftei, Investigating the Vibrational, Magnetic and Dielectric Properties, and Antioxidant Activity of Cerium Oxide Nanoparticles, *International Journal of Molecular Sciences*, 10.3390/ijms232213883, 23, 22, (13883), (2022).

104. Nelson BC, Johnson ME, Walker ML, Riley KR, Sims CM. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants (Basel).* 2016 May 17;5(2):15. doi: 10.3390/antiox5020015. PMID: 27196936; PMCID: PMC4931536.

105. Mingzhe Li, Hua-Jie Niu, Yilong Li, Jiawei Liu, Xiayuan Yang, Yuzhen Lv, Kepi Chen, Wei Zhou, Synergetic regulation of CeO₂ modification and (W₂O₇)₂-intercalation on NiFe-LDH for high-performance large-current seawater electrooxidation, *Applied Catalysis B: Environmental*, 10.1016/j.apcatb.2023.122612, 330, (122612), (2023).

106. Aliksieieva, E., Harkavenko, K. ., Posokhov, Y. ., Prokopyuk, V., Lazurenko, V., & Safonov, R. (2023). Redox status and cell membrane alterations of

circulating leukocytes and erythrocytes in abnormal uterine bleeding. *Problems of Endocrine Pathology*, 80(1), 7-16. Doi: 10.21856/j-PEP.2023.1.01.

107. Tkachenko, A., Onishchenko, A., Prokopyuk, V., Yefimova, S., Klochkov, V., Maksimchuk, P., Posokhov, Y. (2021, September). High Concentrations of GdYVO₄:Eu³⁺ Nanoparticles Alter the State of White Blood Cell Membranes by Increasing Their Microviscosity. In 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP) (pp. NRA05-1) IEEE.

108. Previtali, C. M., Militello, M. P., Grassano, M. E., Arbeloa, E., & Bertolotti, S. G. Eosin B/Amine as Photoinitiator System of Vinyl Polymerization. A Photophysical Study of the Dye. *A Photophysical Study of the Dye*.

109. Liang, X., Zhang, Z., & Fang, H. (2023). Different positions of cyano substitution-controlled directionality of ESIPT processes with two asymmetric proton acceptors system: A TD-DFT study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 436, 114353.

110. Tkachenko, A.S., Klochkov, V.K., Lesovoy, V.N. *et al.* Orally administered gadolinium orthovanadate GdVO₄:Eu³⁺ nanoparticles do not affect the hydrophobic region of cell membranes of leukocytes. *Wien Med Wochenschr* 170, 189–195 (2020). Doi: 10.1007/s10354-020-00735-4.

111. Chatzinikolaou PN, Margaritelis NV, Paschalis V, et al. (2024). Erythrocyte metabolism. *Acta Physiol.* 240:e14081. doi:10.1111/apha.14081.

112. Muro P, Zhang L, Li S, Zhao Z, Jin T, Mao F and Mao Z (2024) The emerging role of oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Front. Endocrinol.* 15:1390351. doi: 10.3389/fendo.2024.1390351.

113. Brostjan, C., Oehler, R. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* 6, 26 (2020). Doi: 10.1038/s41420-020-0255-6.

114. Ramos, C., Oehler, R. Clearance of apoptotic cells by neutrophils in inflammation and cancer. *Cell Death Discov.* 10, 26 (2024). doi:10.1038/s41420-024-01809-7

115. El Kebir D, Filep JG. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through β 2 integrins. *Front. Immunol.* 2013;4:60. doi:10.3389/fimmu.2013.00060.
116. Xu J, et al. Design of diselenide-bridged hyaluronic acid nano-antioxidant for efficient ROS scavenging to relieve colitis. *ACS Nano* (2022) 16:13037–48. doi: 10.1021/acsnano.2c05558.
117. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski* (2020) 48:124–7.
118. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang GM, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci* (2017) 18:120. doi: 10.3390/ijms18010120.
119. Li D, Ding Z, Du K, Ye X, Cheng S. Reactive oxygen species as a link between antioxidant pathways and autophagy. *Oxid Med Cell Longev* (2021) 021:5583215. doi: 10.1155/2021/5583215.
120. Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, et al. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants* (2018) 7:102. doi: 10.3390/antiox7080102.
121. Chopra P, Sagar R, Mukhopadhyay AK. Oxidative Stress Markers (8-Isoprostane and 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine) in Major Depression: A Case-control Study. *J Clin of Diagn Res.* 2021; 15(6):VC01-VC06. Doi: 10.7860/JCDR/2021/47766/14982.
122. Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an update overview. *Arch Toxicol*, (94): 651-715. Doi: 10.1007/s00204-020-02689-3.
123. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm.* 2023; :109-141. doi: 10.1016/bs.vh.2022.09.002. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36707132.
124. Hou Q, Huang J, Ayansola H, Masatoshi H, Zhang B. Intestinal stem cells and immune cell relationships: potential therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* (2021) 11:623691. doi: 10.3389/fimmu.2020.623691.

125. Zhang W, Zou G, Li B, Du X, Sun Z, Sun Y, et al. Fecal microbiota transplantation (FMT) alleviates experimental colitis in mice by gut microbiota regulation. *J Microbiol Biotechnol* (2020) 30:1132–41. doi: 10.4014/jmb.2002.02044.
126. Balmus IM, Ciobica A, Trifan A, Stanciu C. The Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Animal Models. *Saudi J Gastroenterol*. 2016; 22(1):3-17. doi:10.4103/1319-3767.173753.
127. Wu Z-C, Zhao Z-L, Deng J-P, et al. Sanhuang Shu'ai decoction alleviates DSS-induced ulcerative colitis via regulation of gut microbiota, inflammatory mediators and cytokines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;125:109934. doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109934.
128. Zheng, M., Liu, Y., Zhang, G., Yang, Z., Xu, W., & Chen, Q. (2023). The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants*, 12(9), 1675. Doi: 10.3390/antiox12091675.
129. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants - superoxidedismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* (201) 54:287–93. doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
130. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* (2018) 217:1915–28. doi: 10.1083/jcb.201708007.
131. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* (2011) 254:86–99. doi: 10.1016/j.taap.2009.11.028.
132. Abd El Azeem RA, Zedan MM, Saad EA, Mutawi TM, Attia ZR. Singlenucleotide polymorphisms (SNPs) of antioxidant enzymes SOD2 and GSTP1 genes and SLE risk and severity in an Egyptian pediatric population. *Clin Biochem* (2021) 88:37–42. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2020.11.010.

133. Iborra M, Moret I, Rausell F, Bastida G, Aguas M, Cerrillo E, et al. Role of oxidative stress and antioxidant enzymes in Crohn's disease. *Biochem Soc Trans* (2011)39:1102–6. doi: 10.1042/BST0391102.
134. Szczeklik K, Krzysciak W, Domagala-Rodacka R, Mach P, Darczuk D, Cibor D, et al. Alterations in glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in plasma and saliva in relation to disease activity in patients with Crohn's disease. *J Physiol Pharmacol* (2016) 67:709–15.
135. Beltrán B, Nos P, DasíF, Iborra M, Bastida G, Martínez M, et al. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naïve and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* (2010) 16:76–86. doi: 10.1002/ibd.21027.
136. Haneishi Y, Furuya Y, Hasegawa M, Picarelli A, Rossi M, Miyamoto J. Inflammatory bowel diseases and gut microbiota. *Int J Mol Sci* (2023) 24:3817. doi: 10.3390/ijms24043817.
137. Bastaki SMA, Amir N, Adeghate E, Ojha S. *Lycopodium mitigates oxidative stress and inflammation in the colonic mucosa of acetic acid-induced colitis in rats.* *Molecules* (2022) 27:2774. doi: 10.3390/molecules27092774.
138. Gao C, Zhou Y, Chen Z, Li H, Xiao Y, Hao W, et al. Turmeric-derived nanovesicles as novel nanobiologics for targeted therapy of ulcerative colitis. *Theranostics* (2022) 12:5596–614. doi: 10.7150/thno.73650.
139. Bai X, Gou X, Cai P, et al. Sesamin Enhances Nrf2-Mediated Protective Defense against Oxidative Stress and Inflammation in Colitis via AKT and ERK Activation. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019;20. doi: 10.1155/2019/2432416.
140. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, et al. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996;41:2078-86.
141. Wu C, Yang H, Han C, et al. Quyu Shengxin Decoction Alleviates DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice by Suppressing RIP1/RIP3/NLRP3 Signalling.

Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2021;2021:14. doi.org/10.1155/2021/6682233.

142. Alemany-Cosme E, Sáez-González E, Moret I, Mateos B, Iborra M, Nos P, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of crohn's disease and the interconnection with immunological response, microbiota, external environmental factors, and epigenetics. *Antioxidants* (2021) 10:64. doi: 10.3390/antiox10010064.

143. Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PIH. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J* (2016) 473:4527–50. doi: 10.1042/BCJ20160503C 25.

144. Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-Augustin O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* (2014) 20:2394–404. doi: 10.1097/MIB.00000000000020426.

145. Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang CC, Kandaswamy E, Zhou T, et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Front Physiol* (2018) 9:477. doi: 10.3389/fphys.2018.00477.

146. El Kebir D, Filep JG. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through β 2 integrins. *Front. Immunol.* 2013;4:60. doi:10.3389/fimmu.2013.00060.

147. Lushchak VI, Storey KB. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. *EXCLI J* (2021) 20:956–67. doi: 10.17179/excli2021–3596.

148. Fasnacht M, Polacek N. Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology. *Front Mol Biosci* (2021) 8:671037. doi: 10.3389/fmolb.2021.671037.

149. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* (2016) 1863:2977–92. doi: 10.1016/j.bbamcr. 2016.09. 012.

150. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell* (2020) 38:167–97. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.

151. Vona R, Pallotta L, Cappelletti M, Severi C, Matarrese P. The impact of oxidative stress in human pathology: focus on gastrointestinal disorders. *Antioxidants* (2021) 10:201. doi: 10.3390/antiox10020201.
152. M. V. Zhulikova, M. S. Myroshnychenko, O. A. Nakonechna, et al. (2023). Reactive oxygen species generation by blood leucocytes of rats with polycystic ovary syndrome under the conditions of intermittent cold exposure. *Wiadomosci Lekarskie Medical Advances*, 76 (7): 1670—1676. Doi: 10.36740/WLek202307123.
153. Avdagić N, Babić N, Šeremet M, et al. Tumor necrosis factor-alpha serum level in assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases *Med Glas (Zenica)*. 2013;10(2):211-6.
154. van den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, et al. Divergent effects of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001;69:467-473.
155. Cross A, Moots RJ, Edwards SW. The dual effects of TNF α on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bcl-1 *Blood*. 2008;111:878-884.
156. Kitahora T, Suzuki K, Asakura H, et al. Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear leukocytes in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1988;33:951-510
157. Choudhury SM, Sarkar R, Karki R, Kanneganti T-D (2024) A comparative study of apoptosis, pyroptosis, necroptosis, and PANoptosis components in mouse and human cells. *PLoS ONE* 19(2): e0299577. Doi: 10.1371/journal.pone.0299577.
158. Zhang, G., Wang, J., Zhao, Z. et al. Regulated necrosis, a proinflammatory cell death, potentially counteracts pathogenic infections. *Cell Death Dis* 13, 637 (2022). Doi: 10.1038/s41419-022-05066-3.
159. Khoon L, Piran R. A New Strategy in Modulating the Protease-Activated Receptor 2 (Par2) in Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26(1):410. Doi: 10.3390/ijms26010410.
160. Kim, Y.; Lee, Y.; Heo, G.; Jeong, S.; Park, S.; Yoo, J.W.; Jung, Y.; Im, E. (2022). Modulation of Intestinal Epithelial Permeability via Protease-Activated Receptor-2-Induced Autophagy. *Cells*, 11, 87. Doi: 10.3390/cells11050878.

161. Yuan, S.-N.; Wang, M.X.; Han, J.L., et al. (2023). Improved colonic inflammation by nervonic acid via inhibition of NF- κ B signaling pathway of DSS-induced colitis mice. *Phytomedicine*, 112. Doi: 10.1016/j.phymed.2023.154702.

162. Yi, M., Li, T., Niu, M. et al. (2024) Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther*, (9), 176. Doi: 10.1038/s41392-024-01868-3.

163. Liying Zhang, Xiaoming Yu, Wangsheng Liao, et al. (2025). Effects of body weight-supported Tai Chi Yunshou training on upper limb motor function in stroke patients: A three-arm parallel randomized controlled trial, *PLOS ONE*, 20 (1), (e0314025). Doi: 10.137/journal.pone.0314025.

164. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014 Feb 4;104:15.25.1-15.25.14. doi: 10.1002/0471142735.

165. Ott A, Tutdibi E, Goedicke-Fritz S, Schöpe J, et al. (2023). Serum cytokines MCP-1 and GCS-F as potential biomarkers in pediatric inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 18(11):e0288147. doi: 10.1371/journal.pone.0288147. PMID: 37922289; PMCID: PMC10624322.

166. Proma, Maliha Afrin, Daria, Sohel, Nahar, Zabun, Ashraful Islam, Sardar Mohammad, Bhuiyan, Mohiuddin Ahmed and Islam, Md. Rabiul. "Monocyte chemoattractant protein-1 levels are associated with major depressive disorder" *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, vol. 33, no.6, 2022, pp. 735-74. Doi: 10.1515/jbcpp-2021-0132.

167. Aguilera A., Yanez-Mo M., Selgas R., et al. (2005). Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients, *Curr Opin Investig Drugs*, 6: 262-268. PMID: 15816502.

168. Berger, M.; Guiraud, L.; Dumas, A., et al. (2022). Prenatal stress induces changes in PAR2- and M3-dependent regulation of colon primitive cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 323, G609–G626. Doi: 10.152/ajpgi.00061.2022.

169. Morrison NA, Forwood MR. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP1) Accumulation in Human Osteoclast Precursor Cultures. *Life*. 2022; 12(6):789. doi: 10.3390/life12060789.
170. She S, Ren L, Chen P, et al. Functional Roles of Chemokine Receptor CCR2 and Its Ligands in Liver Disease. *Front Immunol*. 2022 Feb 25;13:812431. doi: 10.3389/fimmu.2022.812431. PMID: 35281057; PMCID: PMC8913720.
171. Mo, Z., Liu, D., Chen, Y. *et al.* Single-cell transcriptomics reveals the role of Macrophage-Naïve CD4+ T cell interaction in the immunosuppressive microenvironment of primary liver carcinoma. *J Transl Med* **20**, 466 (2022). Doi: 10.1186/s12967-022-03675-2.
172. Choi JM, Baek SE, Kim JO, et al. 5-LO-derived LTB4 plays a key role in MCP-1 expression in HMGB1-exposed VSMCs via a BLTR1 signaling axis. *Sci Rep*. 2021 May 27;11(1):11100. doi: 10.1038/s41598-021-90636-2. PMID: 34045591; PMCID: PMC8160259.
173. Hu, T.; Zhao, Y.; Long, Y.; Ma, X., et al. TLR4 promoted endoplasmic reticulum stress induced inflammatory bowel disease via the activation of p38 MAPK pathway. *Biosci. Rep.* 2022, 42, BSR20220307.
174. Matthew A Spence, Matthew D Mortimer, Ashley M Buckle, et al. Comprehensive Phylogenetic Analysis of the Serpin Superfamily, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 38, Issue 7, July 2021, Pages 2915–2929. Doi: 10.1093/molbev/msab081.
175. Maoshuang Ran, Jialing Bao, Boning Li, et al. (2025). Microsporidian *Nosema bombycis* secretes serine protease inhibitor to suppress host cell apoptosis via Caspase BmICE PLOS. *Pathogens*, 21(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1012373.
176. Bianchini EP, Auditeau C, Razanakolona M, Vasse M, Borgel D. Serpins in Hemostasis as Therapeutic Targets for Bleeding or Thrombotic Disorders. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Jan 7;7:622778. doi: 10.3389/fcvm.2020.622778.
177. Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T. et al. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen*, 39 (12). Doi: 10.1186/s41232-019-0101-5.

178. Lee, C.H.; Yang, J.R.; Chen, C.Y., et al. (2019). Novel STAT3 Inhibitor LDOC1 Targets Phospho-JAK2 for Degradation by Interacting with LNX1 and Regulates the Aggressiveness of Lung Cancer. *Cancers*, 11(63). Doi: 10.3390/cancers110163.

179. Q. Guo, M. Chen, Q. Chen, G. Xiao, Z. Chen, X. Wang, et al. (2021). Silencing p53 inhibits Interleukin 10-induced activated hepatic stellate cell senescence and fibrotic degradation in vivo. *Exp. Biol. Med.*, 246: 447-458. Doi: 10.1177/1535370220960391.

180. Diez-Martin, E.; Hernandez-Suarez, L.; Muñoz-Villafranca, et al. Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Analysis of Molecular Bases, Predictive Biomarkers, Diagnostic Methods, and Therapeutic Options. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 7062. Doi: 10.3390/ijms25137062.

181. Diez-Martin, E.; Hernandez-Suarez, L.; Muñoz-Villafranca, et al. (2024). Inflammatory bowel diseases: A comprehensive analysis of molecular bases, predictive biomarkers, diagnostic methods, and therapeutic options. *International journal of molecular sciences*, 25: 7062. Doi: 10.3390/ijms25137062.

182. Wilbers RHP, van Raaij DR, Westerhof LB, et al. Re-evaluation of IL-10 signaling reveals novel insights on the contribution of the intracellular domain of the IL-10R2 chain. *PLoS One*. 2017 Oct 10;12(10):e0186317. doi: 10.1371/journal.pone.0186317. PMID: 29016674; PMCID: PMC5634637.

183. Lorent JH, Levental KR, Ganesan L, Rivera-Longsworth G, Sezgin E, Doktorova M, Lyman E, Levental I. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat Chem Biol*. 2020 Jun;16(6):644-652. doi: 10.1038/s41589-020-0529-6. Epub 2020 May 4. Erratum in: *Nat Chem Biol*. 2020 Jun;16(6):710. doi: 10.1038/s41589-020-0564-3. PMID: 32367017; PMCID: PMC7246138.

184. Céspedes PF, Beckers D, Dustin ML, Sezgin E **2021**. Model membrane systems to reconstitute immune cell signaling. *FEBS J*. 288:41070–90. Doi: 10.1111/febs.15488.

185. Larsen AH, Tata L, John LH, Sansom MSP (2021) Membrane-binding mechanism of the EEA1 FYVE domain revealed by multi-scale molecular dynamics simulations. *PLoS Comput Biol* 17(9): e1008807. doi: 10.1371/journal.pcbi.100880.
186. Tkachenko, A.; Onishchenko, A; Posokhov, Y; Myasoedov, V; Nakonechna, O, et al. (2021). Changes in cell membranes of white blood cells treated with a common food additive E407a. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46 (5): 557-562. Doi: 10.1515/tjb-2020-0129.
187. Wang D, Wang S, Zhou Z, et al. White Blood Cell Membrane-Coated Nanoparticles: Recent Development and Medical Applications. *Adv Healthc Mater*. 2022 Apr;11(7):e2101349. doi: 10.1002/adhm.202101349. Epub 2021 Aug 31. PMID: 34468090.
188. Jakobsen RK, Stenspil SG, Chen J, et al. Dynamic Proton Coupled Electron Transfer Quenching as Sensing Modality in Fluorescent Probes. *ChemRxiv*. 2024; doi:10.26434/chemrxiv-2024-zk6gr.
189. Yamamoto, J., Suzuki, Y., Ogawa, Y. et al. (2022). Lipophilic probe behavior in microemulsions evaluated by fluorescence correlation spectroscopy. *ANAL. SCI.*, 38: 401–408. Doi: 10.2116/analsci.21P316.
190. Posokhov, YO, Kyrychenko, A, Korniyenko, Y. Derivatives of 2,5-diaryl-1,3-oxazole and 2,5-diaryl-1,3,4-oxadiazole as environment-sensitive fluorescent probes for studies of biological membranes. In: Geddes, CD, editor. *Reviews in Fluorescence 2017*. Cham: Springer Nature Switzerland AG; 2018:199–230.
191. Binder, H, Gawrisch, K. Effect of unsaturated lipid chains on dimensions, molecular order and hydration of membranes. *J Phys Chem B* 2001;105:12378–90. Doi: 10.1021/jp010118h.
192. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 15;482(3):419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086. Epub 2017 Feb 3. PMID: 28212725; PMCID: PMC5319403.
193. Harayama T, Shimizu T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *J Lipid Res*. 2020 Aug;61(8):1150-1160. doi: 10.1194/jlr.R120000800. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32487545; PMCID: PMC7397749.

194. Díaz M, Fabelo N, Martín MV, et al. Evidence for alterations in lipid profiles and biophysical properties of lipid rafts from spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2024 Mar;102(3):391-402. doi: 10.1007/s00109-024-02419-7. Epub 2024 Jan 29. PMID: 38285093; PMCID: PMC10879240.

195. Tkachenko AS, Klochkov VK, Lesovoy VN, Myasoedov VV, Kavok NS, Onishchenko AI, Yefimova SL, Posokhov YO. Orally administered gadolinium orthovanadate $GdVO_4:Eu^{3+}$ nanoparticles do not affect the hydrophobic region of cell membranes of leukocytes. *Wien Med Wochenschr*. 2020 May;170(7-8):189-195. doi: 10.1007/s10354-020-00735-4. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32052227.

196. Li W, Qi M, Zhou J, Sun Y, Sun J, Dong B, Wang L, Song S. Pathogen-Activated Macrophage Membrane Encapsulated CeO_2 -TCPP Nanozyme with Targeted and Photo-Enhanced Antibacterial Therapy. *Small*. 2024 May;20(19):e2309664. doi: 10.1002/sml.202309664. Epub 2023 Dec 6. PMID: 38057126.

197. Gargin, V., Radutny, R., Titova, G., Bibik, D., et al. (2020). Application of the computer vision system for evaluation of pathomorphological images. 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2020 - Proceedings; 469-473, doi:10.1109/ELNANO50318.2020.9088898.

198. Fulawka, L., Blaszczyk, J., Tabakov, M. et al. Assessment of Ki-67 proliferation index with deep learning in DCIS (ductal carcinoma in situ). *Sci Rep* 12, 3166 (2022). Doi: 10.1038/s41598-022-06555-3.

199. EL-Metwally, D., Monier, D., Hassan, A. et al. Preoperative prediction of Ki-67 status in invasive breast carcinoma using dynamic contrast-enhanced MRI, diffusion-weighted imaging and diffusion tensor imaging. *Egypt J Radiol Nucl Med*, 54, 62 (2023). Doi: 10.1186/s43055-023-01007-y.

200. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, et al. (2019). Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chimica Acta*; 491: 39–45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011.

201. Louis DM, Nair LM, Vallonthaiel AG, Narmadha MP, Vijaykumar DK. Ki 67: a Promising Prognostic Marker in Early Breast Cancer-a Review Article. *Indian J*

Surg Oncol. 2023 Mar;14(1):122-127. doi: 10.1007/s13193-022-01631-6. Epub 2022 Sep 1. PMID: 36891414; PMCID: PMC9986372.

202. Song Z, Zhou Q, Zhang JL, Ouyang J, Zhang ZY. Marker Ki-67 is a potential biomarker for the diagnosis and prognosis of prostate cancer based on two cohorts. *World J Clin Cases*. 2024 Jan 6;12(1):32-41. doi: 10.12998/wjcc.v12.i1.32. Erratum in: *World J Clin Cases*. 2024 Dec 26;12(36):6950-6951. doi: 10.12998/wjcc.v12.i36.6950. PMID: 38292624; PMCID: PMC10824173.

203. James KR, Gomes T, Elmentaite R, Kumar N, Gulliver EL, King HW, Stares MD, Bareham BR, Ferdinand JR, Petrova VN, et al. Distinct microbial and immune niches of the human colon. *Nat Immunol*. 2020 Mar; 21(3):343-353. doi: 10.1038/s41590-020-0602-z. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32066951; PMCID: PMC7212050.

204. Babenko O., Vasylyeva I., Nakonechna O., Popova L., Voitenko S., Pustova N. (2022). The viability of leukocytes and reactive oxygen species generation by them in rats with chronic colitis. *Weadomosci lekarskie*, 75 (9 pt 2), 2270-2274. Doi: 10.36740/Wlek202209216.

205. Nakonechna O.A, Vyshnytska I, Vasylyeva I.M, Babenko O.V, Voitenko S.A, Bondarenko A.V, Gargin V. (2022). The significance of ischemia for the proliferative activity of the mucosa in inflammatory bowel diseases. *Georgian medical news*, 7 (328), 133-137. PMID: 36318857.

206. Бабенко О. В., Наконечна О. А. (2025). Стан оксидантно-антиоксидантної системи в організмі щурів з експериментальним колітом. *Актуальні проблеми сучасної медицини*, 1 (89), 102-106. Doi: 10.31718/2077-10.96.25.1.102.

207. Бабенко О. В. (2025). Роль моноцитарно-хемокінового протеїну-1 в патогенезі хронічного коліту у щурів. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 1 / 2 (103 -104), 59 – 63. Doi: 10.25040/ecpb2025.01-02.059.

208. Наконечна О. А., Васильєва І. М., Бабенко О. В. Дослідження вмісту серпіну А4 в крові у щурів з експериментальним колітом. *Науково-практична*

конференція з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії» (01 жовтня 2021 р., м. Харків, Україна), С. 192-193.

209. Брюханова Т. О., Бабенко О. В. Генерація активних форм кисню у популяції лейкоцитів щурів з експериментальним колітом. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 24 – 26 січня 2022 р.), С. 29 – 30.

210. Бабенко О. В., Васильєва І. М. Вміст лейкоцитів в крові щурів при формуванні неспецифічного виразкового коліту. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 13 -15 лютого 2023 р.), С. 336 – 338.

211. Бабенко О. В., Васильєва І. М., Наконечна О. А. Особливості генерації активних форм кисню лейкоцитами за умов неспецифічного виразкового коліту. Міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція до Всесвітнього дня анатомії (м. Харків, 17 жовтня 2024 р.), С. 106 – 139.

212. Бабенко О. В., Таран О. С., Васильєва І. М. Визначення активності деяких білків гострої фази при експериментальному неспецифічному виразковому коліті. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 15 -17 січня 2024 р.), С. 161 – 162.

213. Бабенко О. В., Васильєва І. М. Стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи у щурів з експериментальним хронічним колітом. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 5 - 7 лютого 2025 р.), С. 324–325.

214. Бабенко О. В. Визначення рівнів цитокінів в крові щурів з експериментальним хронічним колітом. Другі наукові читання пам'яті професора Д. О. Альперна: міжнародна науково-практична конференція (м. Харків, 08 - 09 травня 2025 р.), С. 24–26.

215. Бабенко О. В. Дослідження фосфоліпідного бішару лейкоцитів в крові щурів з експериментальним хронічним колітом. Здобутки клінічної та експериментальної медицини (м. Тернопіль, 12-13 червня 2025 р.), С. 204 – 206.

216. Васильєва І. М., Бабенко О. В., Наконечна О. А., Попова Л. Д., Войтенко С. А. (2021). Порівняльний аналіз двох видів контролю при формуванні експериментальної моделі хронічного виразкового коліту. Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 4, 56 – 59. Doi: 10.11603/1811-2471.2021.v.i4.12799.

217. Бабенко О. В., Брюханова Т. О., Наконечна О. А., Васильєва І. М., Стеценко С. О. (2022). Порівняльна характеристика експериментальних моделей хронічного коліту, що відтворюється в умовах *in vivo*. *Medicine today and tomorrow*, 91 (1), 6 – 16. Doi: 10.35339/msz.2022.91.1.bbn.

218. Брюханова Т. О., Наконечна О. А., Бабенко О. В. (2023). Сучасний стан, проблеми та перспективи медикаментозної корекції виразкового коліту (огляд літератури). *Bulletin of problems in biology and medicine*, 3 (170)/ 28 – 32. Doi: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-28-39.

219. Бабенко О. В., Васильєва І. М., Ярмиш Н. В., Наконечна О. А. (2024). Сучасні уявлення про патогенетичні механізми розвитку запальних захворювань кишківника. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 1(99), 20-27. Doi: 10.25040/ecrb2024.01

ДОДАТОК А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Babenko O., Vasylyeva I., Nakonechna O., Popova L., Voitenko S., Pustova N. (2022). The viability of leukocytes and reactive oxygen species generation by them in rats with chronic colitis. *Weadomosci lekarskie*, 75 (9 pt 2), 2270-2274. <https://doi.org/10.36740/Wlek202209216>. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

2. Nakonechna O.A, Vyshnytska I, Vasylyeva I.M, Babenko O.V, Voitenko S.A, Bondarenko A.V, Gargin V. (2022). The significance of ischemia for the proliferative activity of the mucosa in inflammatory bowel diseases. *Georgian medical news*, 7 (328), 133-137. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

3. Бабенко О. В., Наконечна О. А. (2025). Стан оксидантно-антиоксидантної системи в організмі щурів з експериментальним колітом. *Актуальні проблеми сучасної медицини*, 1 (89), 102-106. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.25.1.102>. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

4. Бабенко О. В. (2025). Роль моноцитарно-хемокінового протеїну-1 в патогенезі хронічного коліту у щурів. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

Опубліковані наукові праці апробаційного характеру:

5. Наконечна О. А., Васильєва І. М., Бабенко О. В. Дослідження вмісту серпіну А4 в крові у щурів з експериментальним колітом. *Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та*

клінічної біохімії» (01 жовтня 2021 р., м. Харків, Україна), С. 192-193. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

6. Брюханова Т. О., Бабенко О. В. Генерація активних форм кисню у популяції лейкоцитів щурів з експериментальним колітом. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 24 – 26 січня 2022 р.), С. 29 – 30. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

7. Бабенко О. В., Васильєва І. М. Вміст лейкоцитів в крові щурів при формуванні неспецифічного виразкового коліту. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 13 -15 лютого 2023 р.), С. 336 – 338. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

8. Бабенко О. В., Васильєва І. М., Наконечна О. А. Особливості генерації активних форм кисню лейкоцитами за умов неспецифічного виразкового коліту. Міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція до Всесвітнього дня анатомії (м. Харків, 17 жовтня 2024 р.), С. 106 – 139. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз і статистичну обробку даних та підготовлено матеріали до друку).*

9. Бабенко О. В., Таран О. С., Васильєва І. М. Визначення активності деяких білків гострої фази при експериментальному неспецифічному виразковому коліті. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та студентів (м. Харків, 15 -17 січня 2024 р.), С. 161 – 162. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

10. Бабенко О. В., Васильєва І. М. Стан ензиматичної ланки антиоксидантної системи у щурів з експериментальним хронічним колітом. Медицина третього тисячоліття: міжвузівська конференція молодих вчених та

студентів (м. Харків, 5 - 7 лютого 2025 р.), С. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

11. Бабенко О. В. Визначення рівнів цитокінів в крові щурів з експериментальним хронічним колітом. Другі наукові читання пам'яті професора Д. О. Альперна: міжнародна науково-практична конференція (м. Харків, 08 - 09 травня 2025 р.), С. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

Наукові праці, які додатково відображають результати дисертаційної роботи:

12. Васильєва І. М., Бабенко О. В., Наконечна О. А., Попова Л. Д., Войтенко С. А. (2021). Порівняльний аналіз двох видів контролю при формуванні експериментальної моделі хронічного виразкового коліту. Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 4, 56 – 59. <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2021.v.i4.12799>. *(Здобувачем проведені експериментальні дослідження, аналіз отриманих даних та статистичну обробку й підготовлено матеріали до друку).*

13. Бабенко О. В., Брюханова Т. О., Наконечна О. А., Васильєва І. М., Стеценко С. О. (2022). Порівняльна характеристика експериментальних моделей хронічного коліту, що відтворюється в умовах in vivo. Medicine today and tomorrow, 91 (1), 6 – 16. <https://doi.org/10.35339/msz.2022.91.1.bbn>. *(Здобувач брав участь у підготовці матеріалу до друку).*

14. Брюханова Т. О., Наконечна О. А., Бабенко О. В. (2023). Сучасний стан, проблеми та перспективи медикаментозної корекції виразкового коліту (огляд літератури). Bulletin of problems in biology and medicine, 3 (170)/ 28 – 32. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-3-170-28-39>. *(Здобувач брав участь у підготовці матеріалу до друку).*

15. Бабенко О. В., Васильєва І. М., Ярмиш Н. В., Наконеча О. А. (2024). Сучасні уявлення про патогенетичні механізми розвитку запальних захворювань кишківника. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 1(99), 20-27. <https://doi.org/10.25040/ecpb2024.01>. *(Здобувач брав участь у підготовці матеріалу до друку).*

ДОДАТОК Б

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні питання експериментальної та клінічної біохімії» (м. Харків, Україна, 1 жовтня 2021 р.) – публікація тез та усна доповідь.
2. Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 24-26 січня 2022 р.) - публікація тез та усна доповідь.
3. Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 13-15 лютого 2023 р.) - публікація тез та усна доповідь.
4. Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 15-17 січня 2024 р.) - публікація тез та усна доповідь.
5. Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції до Всесвітнього дня анатомії (м Харків, Україна, 17 жовтня 2024 р.) - публікація тез та усна доповідь.
6. Фестивалі молодіжної науки «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, Україна, 5-7 лютого 2025 р.) - публікація тез та усна доповідь.
7. Других наукових читаннях пам'яті професора Д. О. Альперна: міжнародна науково-практична конференція (м. Харків, Україна, 8-9 травня 2025р.) - публікація тез та усна доповідь.
8. Підсумковій LXVIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, Україна, 12-13 червня 2025 р.) - публікація тез та усна доповідь.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Чорноморського національного
 університету імені Петра Могили

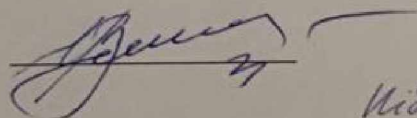
професор Роман ДИЖОС
 « » 2025 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: Визначення генерації активних форм кисню в лейкоцитах периферичної крові та видів клітинної загибелі лейкоцитів щурів за умов експериментального хронічного коліту.
2. Ким і коли запропоновано кафедра біологічної хімії Харківського національного медичного університету, 61022, м. Харків, проспект Науки, 4, аспірантка кафедри – Бабенко Ольга В'ячеславівна; 2019-2023 рр.
3. Джерело інформації: 1) звіт про науково-дослідну роботу кафедри біологічної хімії на тему: «Біохімічні механізми індукції запалення кишечника та засоби його корекції», номер державної реєстрації: 0120U102654, 2019-2023 рр.; 2) The viability of leucocytes and reactive oxygen species generation by then in rats with chronic colitis; Weadomosci lekarskie, 75(9 pt 2), 2022, 2270-2274.
4. Де і коли впроваджено: кафедра морфології та громадського здоров'я Навчально-наукового медичного інституту ЧНУ імені Петра Могили.
5. Результати застосування методу за період з 2022 по 2025 рр. Впроваджено у навчально-науковий процес, що дозволяє здобувачам вищої освіти отримати теоретичні знання щодо генерації активних форм кисню та видів клітинної загибелі лейкоцитів в крові і сучасних методів оцінки процесів апоптозу в організмі за умов запалення за допомогою проточного цитометру.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації: використання результатів наукових досліджень Бабенко О.В. у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти щодо генерації активних форм кисню в лейкоцитах, оцінки життєздатності та видів клітинної загибелі лейкоцитів за умов хронічного запалення в організмі.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися.

Відповідальний за впровадження

В.о. завідувача кафедри морфології та громадського здоров'я Навчально-наукового медичного інституту ЧНУ імені Петра Могили
 д.мед.н., професор Валерій Степанович Черно



Відомо



Відомо
 Надано завіренню
 С. Горюхов



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
проф. І.В. ЗАВГОРОДНІЙ
« ___ » _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: Визначення активності процесів проліферації в слизовій оболонці товстої кишки за рівнем експресії Ki67 за умов експериментального хронічного коліту.

2. Ким і коли запропонований: кафедра біологічної хімії Харківського національного медичного університету, 61022, м. Харків, проспект Науки, 4, аспірантка кафедри - Бабенко Ольга В'ячеславівна; 2019 - 2023 рр.

3. Джерело інформації: 1) звіт про науково - дослідну роботу біологічної хімії ХНМУ на тему: «Біохімічні механізми індукції запалення кишечника та засоби його корекції», номер державної реєстрації: 0120U102654, 2019 - 2023 рр; 2) The significance of ischemia for the proliferative activity of the mucosa in inflammatory bowel diseases; Georgian Medical News №7 (328), 2022, 133-137.

4. Де і коли впроваджено: кафедра загальної та клінічної патологічної фізіології ХНМУ ім. Д.О. Альперна.

5. Результати застосування методу за період з 2019 по 2024 рр. Впроваджено у навчально - науковий процес, що дозволяє здобувачам вищої освіти отримати теоретичні знання щодо ролі процесів проліферації у розвитку запальних процесів кишечника і сучасних методів оцінки проліферативної активності за допомогою імуногістохімічного маркера - Ki67.

6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації: використання результатів наукових досліджень Бабенко О.В. у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти щодо кореляції активності проліферативних процесів у слизовій оболонці товстої кишки за умов експериментальної ішемії та методів її корекції.

7. Зауваження, пропозиції: не вносилися.

Відповідальні за впровадження

Завідувач кафедри
загальної та клінічної
патологічної фізіології ХНМУ ім. Д.О. Альперна
д.мед.н., проф. Михайло Сергійович МИРОШНИЧЕНКО



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
проф. І.В. ЗАВГОРОДНІЙ
« ___ » _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: Визначення активності процесів проліферації в слизовій оболонці товстої кишки за рівнем експресії Ki67 за умов експериментального хронічного коліту.

2. Ким і коли запропонований: кафедра біологічної хімії Харківського національного медичного університету, 61022, м. Харків, проспект Науки, 4, аспірантка кафедри - Бабенко Ольга В'ячеславівна; 2019 - 2023 рр.

3. Джерело інформації: 1) звіт про науково - дослідну роботу біологічної хімії ХНМУ на тему: «Біохімічні механізми індукції запалення кишечника та засоби його корекції», номер державної реєстрації: 0120U102654, 2019 - 2023 рр; 2) The significance of ischemia for the proliferative activity of the mucosa in inflammatory bowel diseases; Georgian Medical News №7 (328), 2022, 133-137.

4. Де і коли впроваджено: кафедра загальної та клінічної патологічної фізіології ХНМУ ім. Д.О. Альперна.

5. Результати застосування методу за період з 2019 по 2024 рр. Впроваджено у навчально - науковий процес, що дозволяє здобувачам вищої освіти отримати теоретичні знання щодо ролі процесів проліферації у розвитку запальних процесів кишечника і сучасних методів оцінки проліферативної активності за допомогою імуногістохімічного маркеру - Ki67.

6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації: використання результатів наукових досліджень Бабенко О.В. у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів вищої освіти щодо кореляції активності проліферативних процесів у слизовій оболонці товстої кишки за умов експериментальної ішемії та методів її корекції.

7. Зауваження, пропозиції: не вносилися.

Відповідальні за впровадження

Завідувач кафедри
загальної та клінічної
патологічної фізіології ХНМУ ім. Д.О. Альперна
д.мед.н., проф. Михайло Сергійович МИРОШНИЧЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
університету
ім. В.Н.Каразіна

д.фіз.-мат.н., проф. Азаренков М.О.

«23» жовтня 2020 року



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Назва пропозиції для впровадження: Можливість використання флуоресцентних зондів для аналізу впливу наночастинок $GdVO_4:Eu^{3+}$ на стан мембран лейкоцитів.

2. Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів Харківський національний медичний університет, м. Харків, пр-т. Науки, 4, 61022.

Посохов Є.О., Наконечна О.А., М'ясоєдов В.В., Ткаченко А.С., Клочков В.К., Кавок Н.С., Єфімова С.Л., Оніщенко А.І., Бабенко О.В.

3. Джерела інформації:

1. Orally administered gadolinium orthovanadate $GdVO_4:Eu^{3+}$ nanoparticles don't affect the hydrophobic region of cell membranes of leukocytes / A.S. Tkachenko, V.K. Klochkov, V.N. Lesovoy, V.V. Myasoedov, N.S. Kavok, A.S. Onishchenko, S.L. Yefimova, Y.O. Posokhov // Wiener Medizinische Wochenschrift – 2020. – Vol. 170, № 7. – P. 189-195. <https://doi.org/10.1007/s10354-020-00735-4>

4. Впроваджено: на кафедрі біологічної хімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна.

5. Включено: в лекційний курс і практичні заняття з біологічної хімії.

Результати впровадження: у лекційний курс і практичні заняття.

6. Термін впровадження: 2020-2021 рік.

7. Базова установа, яка здійснює впровадження: Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися.

Відповідальний за впровадження завідувач
кафедри біологічної хімії Харківського
національного університету
ім. В.Н. Каразіна
д.біол.н., професор

Є.Е. Перський

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

 Проректор з науково-педагогічної роботи
 Національного фармацевтичного університету
 проф. І.М. ВЛАДИМИРОВА
 _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: Оцінка генерації активних форм кисню та життєздатності й видів клітинної загибелі лейкоцитів у щурів з модельованим хронічним запаленням кишечника.
2. Ким і коли запропонований: кафедра біологічної хімії Харківського національного медичного університету, 61022, м. Харків, проспект Науки, 4, аспірантка кафедри - Бабенко Ольга В'ячеславівна; 2019 - 2023 рр.
3. Джерело інформації: 1) звіт про науково - дослідну роботу кафедри біологічної хімії ХНМУ на тему: «Біохімічні механізми індукції запалення кишечника та засоби його корекції», номер державної реєстрації: 0120U102645, 2019–2023 рр; 2) O. Babenko, I. Vasylyeva, O. Nakonechna, L. Popova et al. (2022): The viability of leucocytes and reactive oxygen species generation by them in rats with chronic colitis. Wiadomosci Lekarskie, Vol. LXXV, issue 9 part 2, 2022, 2270-2274.
4. Де і коли введено: кафедра клінічної лабораторної діагностики, мікробіології та біологічної хімії НФаУ.
5. Результати застосування методу за період з 2019 по 2024 рр. Введено у навчально - науковий процес, що дозволяє здобувачам всіх рівнів медичної освіти отримати вагомі теоретичні знання щодо оцінки генерації активних форм кисню та життєздатності й видів клітинної загибелі лейкоцитів, а також сучасні уявлення щодо патогенетичних механізмів експериментального хронічного коліту.
6. Ефективність введено за критеріями, висловленими в джерелі інформації: використання результатів наукових досліджень Бабенко О. В. у навчальному процесі дозволяє розширити знання здобувачів освіти щодо ролі процесів апоптозу в патогенезі хімічно індукваного хронічного.
7. Зауваження, пропозиції: не вносилися.

Відповідальні за впровадження

Завідувачка кафедри клінічної лабораторної діагностики,
 мікробіології та біологічної хімії НФаУ
 д.біол.н., проф. Віра Миколаївна КРАВЧЕНКО

20.02.2025
 (дата)

 (підпис)

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 15:48:25 17.10.2025

Назва файлу з підписом: дисертація Бабенко О.В. PDF A.pdf.asice

Розмір файлу з підписом: 4.8 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: дисертація Бабенко О.В. PDF A.pdf

Розмір файлу без підпису: 5.4 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Бабенко Ольга В'ячеславівна

П.І.Б.: Бабенко Ольга В'ячеславівна

Країна: Україна

РНОКПП: 2995311822

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 16:48:17 17.10.2025

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF970400000037851001490CB304

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ 4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASiC-E)

Формат підпису: З повними даними для перевірки (XAdES-B-LT)

Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.08.25 13:00