

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра фізіології людини і тварин

Завідувач кафедри д.б.н., проф. Макарчук М.Ю.

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 2023 р.

**ЕФЕКТ НАНОЧАСТИНОК ДИМУ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА
ЦІЛІСНІСТЬ КИШКОВОГО БАР'ЄРУ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Цимбалюк Анастасії Миколаївни
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доц. Кравченко В.І.

Робота виконана на базі ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, під
керівництвом к.б.н., Довбинчук Таїси Володимирівни.

Оцінка захисту роботи

Київ-2023 р.

АНОТАЦІЯ

У роботі було досліджено хронічний вплив наночастинок диму, отриманих у результаті згоряння деревини тополі, на стан шлунково-кишкового тракту за умов гострого коліту та ліпополісахарид-індукованої хвороби Паркінсона. У роботі було використано такі методи досліджень: реєстрація електрофізіологічних характеристик у камері Уссінга, апоморфіновий тест, спектрофотометрія, реакція Шифа. У роботі було змодельовано хронічний вплив наночастинок диму, отриманих від згоряння деревини тополі, а також змодельовано виразковий коліт шляхом введення йодоацетаміду та хворобу Паркінсона шляхом унілатерального введення ліпополісахариду та показано прогресивну втрату дофамінергічних нейронів. Хронічний вплив твердих частинок диму природного походження на фоні коліту та хвороби Паркінсона мав негативний вплив на бар'єрну функцію товстої кишки, зумовлюючи зниження струму короткого замикання та трансепітеліального опору епітеліального шару органу. Під впливом твердих частинок диму відмічалось збільшення проникності товстої кишки, збільшення активності мієлопероксидази, зниження гліканової частини глікопротеїнів слизу органу, а також значне посилення негативних наслідків запальних захворювань кишечника та нейрозапалення.

Кваліфікаційна робота викладена на 59 сторінках, ілюстрована 12 діаграмами. Список використаних джерел включає 110 робіт.

Ключові слова: тверді частинки диму природного походження, кишковий бар'єр, виразковий коліт, хвороба Паркінсона.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	–	активні форми кисню;
БК	–	виразковий коліт;
ДА	–	дофамінергічні;
ЗЗК	–	запальні захворювання кишечника;
ЛПС	–	ліпополісахарид;
МПО	–	мієлопероксидаза;
НМС	–	немоторні симптоми;
ОС	–	оксидативний стрес;
ПВДФ	–	полівінілідендифлуорид;
ХП	–	хвороба Паркінсона;
ЦНС	–	центральна нервова система;
ШКТ	–	шлунково-кишковий тракт;
PM	–	<i>particulate matter</i> (тверді частинки);
PM _c	–	PM диму, отриманих від згоряння деревини тополі;
SNpc	–	<i>substantia nigra pars compacta</i> (компактна частина чорної субстанції);

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	7
1.1. Характеристика складу забрудненого повітря	8
1.2. Характеристика твердих частинок.....	9
1.3. Вплив твердих частинок на організм	11
1.4. Виразковий коліт	15
1.5. Хвороба Паркінсона.....	17
1.5.1. Етіологія хвороби Паркінсона.....	17
1.5.2. Симптоми хвороби Паркінсона.....	19
1.5.3. Порухення з боку шлунково-кишкового тракту при хворобі Паркінсона.....	20
1.5.4. Моделі хвороби Паркінсона	23
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	26
2.1. Реактиви та матеріали	26
2.2. Експериментальні тварини	26
2.3. Схема експерименту.....	27
2.4. Моделювання хронічного впливу наночастинок диму	30
2.5. Моделювання експериментального коліту	31
2.6. Визначення ендотеліальної проникності товстої кишки	31
2.7. Визначення глікопротеїнів слизу методом реакції Шифа на ПВДФ мембрані	31
2.8. Визначення активності мієлопероксидази слизової оболонки товстої кишки.....	33
2.9. Моделювання ЛПС-викликаної хвороби Паркінсона	33

2.10. Апоморфіновий тест	34
2.11. Визначення маси тіла щурів	34
2.12. Визначення загальної маси товстої кишки	35
2.13. Визначення загальної маси тимусу, селезінки та цекуму	35
2.14. Визначення вмісту води у фекаліях	36
2.15. Реєстрація електрофізіологічних характеристик бар'єрної функції товстої кишки щурів у камері Уссінга	36
2.16. Статистична обробка результатів	37
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їхнє обговорення	38
3.1. Вплив довготривалого введення препарату РМ диму на анатомо-фізіологічні показники щурів	38
3.2. Вплив РМ диму на фізіологічні на біохімічні показники щурів з йодоацетамід-індукованим паркінсонізмом	42
3.2.1. Вплив РМ диму на зміни ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки	42
3.2.2. Вплив РМ диму на зміни рівня активності мієлопероксидази у товстій кишці щурів	44
3.2.3. Кількісні зміни поверхневого слизу товстої кишки щурів за хронічного впливу препарату РМ диму	46
3.3. Оцінка ступеня нейродегенерації у щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом	48
3.4. Вплив препарату РМ _С на електрофізіологічні показники бар'єрної функції епітелію товстої кишки	50
3.4.1. Вплив препарату РМ _С на електрофізіологічні показники бар'єрної функції епітелію товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим колітом	51

3.4.2. Вплив препарату РМ _С на електрофізіологічні показники бар'єрної функції епітелію товстої кишки щурів з ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.....	54
ВИСНОВКИ	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	60

ВСТУП

Швидкі темпи урбанізації та індустріалізації суспільства значно збільшили рівень забруднення повітря за останнє десятиліття. Згідно з дослідженням Global Burden of Disease у 2019 році, забруднення повітря посідає четверте місце у світі серед факторів ризику виникнення захворювань різних систем організму та передчасної смертності, зумовлюючи понад 13 мільйонів смертей щороку [1]. Більш того, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, близько 90% людей дихають повітрям, яке не відповідає максимально допустимим нормам забрудненості [2].

Забруднення повітря може відбуватися різними речовинами: газами, хімічними сполуками, біологічними агентами, твердими частинками (*particulate matter*, PM) тощо. Кумулятивні епідеміологічні та експериментальні дослідження показали, що найбільшу небезпеку становлять саме PM, оскільки вони здатні глибоко проникати в організм людини, зумовлюючи розвиток запальних, оксидативних та канцерогенних процесів [3]. Більш того, дані сучасних досліджень свідчать про те, що PM викликають не лише респіраторні та серцево-судинні захворювання, а також здатні зумовлювати розвиток запальних захворювань травної системи та нейродегенеративних захворювань центральної нервової системи (ЦНС). Осідаючи у дихальних шляхах, PM шляхом мукоциліарного кліренсу потрапляють до нижчих відділів шлунково-кишкового тракту (ШКТ), де вони здатні змінювати видове співвідношення мікробіоти, знижувати епітеліальну проникність та бактеріальний кліренс, індукувати оксидативний стрес (ОС) та збільшувати експресію прозапальних цитокінів [4]. З впливом PM пов'язують розвиток синдрому подразненого кишечника, коліту, хвороби Крона тощо. Порушення функціонування ШКТ, у свою чергу, відіграють значну роль у патогенезі хвороби Паркінсона (ХП). З кожним роком з'являється все більше підтверджень наявності так-званої осі «кишечник-мозок», яка являє собою двосторонній зв'язок між ШКТ та нервовою

системою. Дані сучасних досліджень підтверджують, що розвиток ХП у деяких випадках передбачає трансинаптичне захоплення нейротоксинів, які здатні індукувати ХП, та їх переміщення від нервових сплетень кишечника до чорної речовини середнього мозку (SNpc). Порушення в ЦНС, у свою чергу, зумовлюють дегенерацію нейронів та гліальних клітин ентеральної нервової системи, що негативно впливає на моторну та всмоктувальну функцію кишечника, сприяє розвитку багатьох патологічних станів, таких як, наприклад, порушення харчової поведінки, мальнутриції, прогресивної втрати ваги, закріпів та застійних явищ, які зумовлюють дискомфорт та інтоксикацію всього організму [5].

Проте, роль РМ повітря у патологічних процесах запальних захворювань кишечника (ЗЗК) та нейродегенеративних захворювань, зокрема ХП, і досі залишається маловивченою. Тому, дослідження впливу РМ на цілісність кишкового бар'єру та епітеліальну проникність може дати глибше розуміння у профілактиці та лікуванні цих захворювань.

Метою даної роботи було дослідити хронічний вплив наночастинок диму, отриманих у результаті згоряння деревини тополі (РМ_С), на стан ШКТ за умов гострого коліту та ЛПС (ліпополісахарид)-модельованої ХП.

Згідно поставленої мети необхідним було виконання наступних завдань:

1. Змодельовати хронічний вплив наночастинок диму тополі у щурів.
2. Змодельовати йодоацетамід-індуковану модель коліту та ЛПС-індуковану модель паркінсонізму у щурів та дослідити їх фізіологічні параметри.
3. Дослідити біохімічні та фізіологічні зміни у ШКТ щурів з гострим колітом та паркінсонізмом.
4. Дослідити вплив РМ_С на апоморфін-індуковану поведінку щурів з ЛПС-викликаним паркінсонізмом.
5. Дослідити зміни бар'єрної функції товстої кишки щурів з гострим колітом та ЛПС-індукованим паркінсонізмом за впливу наночастинок диму.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Забруднення повітря – це явище потрапляння шкідливих для здоров'я та життя людини і інших організмів речовин різного хімічного складу та походження, пов'язане із високим ризиком передчасної смертності внаслідок серцево-судинних захворювань, хронічної обструктивної хвороби легень, раку легень тощо [6]. Найбільше від забруднення атмосферного повітря страждають люди, які живуть у країнах, що розвиваються, а також у перенаселених країнах. Так, у 2016 році, 91% передчасних смертей припало саме на країни з низьким та середнім рівнем доходу Південно-Східної Азії, Центральної Африки та Східної Європи, де ці явища найбільше поширені [7]. Більш того, приблизно 3 мільярди людей щороку піддаються впливу високого рівня забруднення повітря у власних домівках, у зв'язку із використанням природного палива, газу та вугілля для приготування їжі, опалення приміщень та інших побутових цілей [8].

1.1. Характеристика складу забрудненого повітря

Склад забрудненого повітря варіює у залежності від джерела забруднення, кількості та швидкості викидів, погодних умов тощо. Джерела забруднення повітря поділяються на природні, наприклад вулканічні викиди, лісові пожежі тощо, та антропогенні. За походженням забруднювачі повітря можна класифікувати на первинні та вторинні. До первинних забруднювачів можна віднести ті речовини, які викидаються в атмосферу безпосередньо із ідентифікованих джерел забруднення, наприклад, викиди транспортних засобів, промислових заводів та фабрик, під час пилових бур. Вторинними забруднювачами є сполуки, які утворюються у верхніх шарах атмосфери в результаті взаємодії між первинними забруднювачами та іншими складовими

повітря. До вторинних забруднювачів належать триоксид сірки, озон, кетони, сірчана кислота, азотна кислота, вугільна кислота та інші [10]. За розміром частинки, що забруднюють повітря, можна класифікувати на газоподібні речовини та тверді частинки (PM). До основних газоподібних забруднювачів повітря належать неорганічні гази, такі як діоксид азоту, діоксид сірки, озон, чадний газ, діоксид вуглецю, а також леткі поліциклічні сполуки тощо [11]. PM, в свою чергу, мають гетерогенну структуру, походження та склад. Їхній розмір, фізичні та термодинамічні характеристики дозволяють їм залишатися у повітрі впродовж довгого періоду часу і глибоко проникати в організм людини, у зв'язку з чим вони вважаються найбільш небезпечними [12].

1.2. Характеристика твердих частинок

Тверді частинки, або атмосферні аерозольні частинки, – це узагальнений термін, який застосовується для позначення збірної групи забруднювачів повітря, до якої входять вуглецеві сполуки з абсорбованими органічними речовинами та/або важкими реакційно здатними металами, такими як мідь, цинк, залізо, ванадій та нікель. Також до складу PM можуть входити сульфати, нітрати, поліциклічні ароматичні вуглеводні тощо [13]. PM можуть мати елементарну або комплексну хімічну будову та різнитися за формою і розміром. Більш того, їхній склад може змінюватися при взаємодії з іншими PM, що знаходяться у повітрі, за окислювальної дії озону, низького рівня рН навколишнього середовища [14]. За походженням PM можуть бути природними (лісові пожежі, пил, морські бризи тощо), та антропогенними (спалювання дизельного пального, вугілля та біомаси, викиди при переробленні металу, використання аерозолів тощо) [15]. Зважаючи на різномірний склад і походження PM, основним параметром їх класифікації є розмір. За розміром частинок виділяють грубі, дрібні та наддрібні (рис. 1.1) [16].

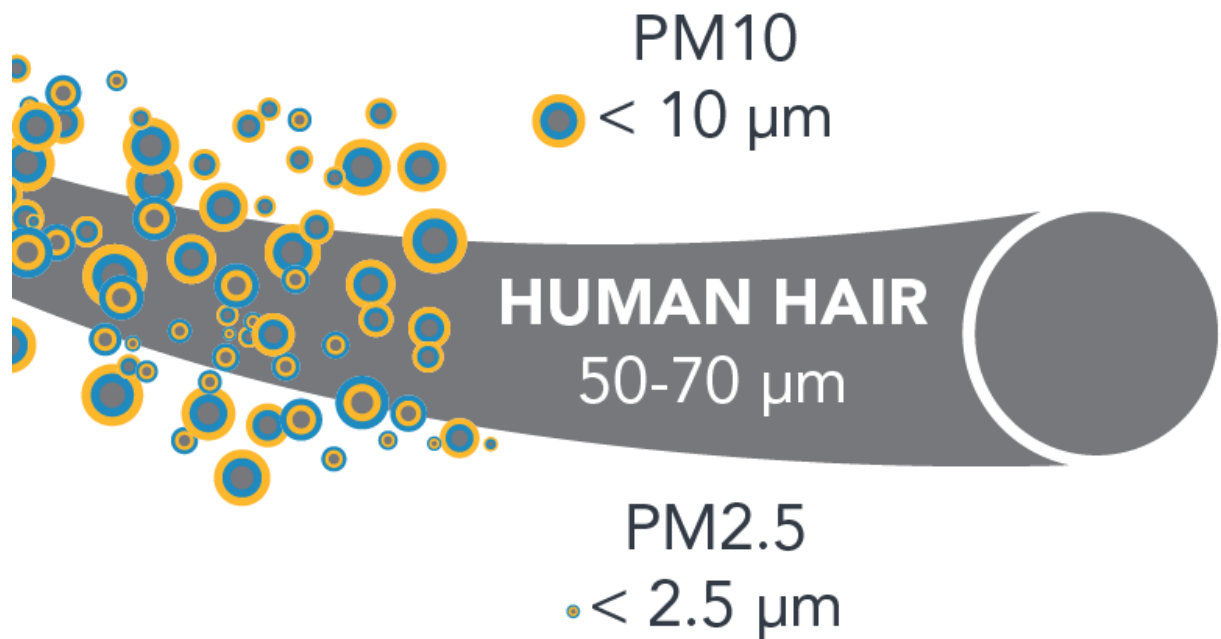


Рис. 1.1. Розмір основних груп твердих частинок у порівнянні із діаметром людської волосини

Грубі частинки, або PM10, є найбільшими з усіх частинок, їхній діаметр становить до 10 мкм. Вони походять із численних природних та антропогенних джерел: будівництв, спалення вугілля та нафти, шахтарства, вивітрювання та ресуспензювання ґрунтів, фермерства. До цієї групи PM належать пил, частинки ґрунту, вугільна, нафтова та дерев'яна зола, оксиди металів, спори грибів та пилок. Зважаючи на їх великий розмір, термін життя таких частинок варіює у межах декількох годин. Грубі PM поширюються на відстань від 1 до 10 км [17]. Дрібні та наддрібні частинки мають діаметр 2,5 мкм та 0,1 мкм і позначаються PM2,5 та PM0,1 відповідно. Вони утворюються в результаті перетворення з газоподібних попередників, наприклад, оксиду азоту, аміаку, діоксиду сірки, неметанових летких сполук, у ході пилових бур, лісових пожеж, бризів та ураганів [18]. До антропогенних джерел походження цих PM належать меліорація, спалювання викопного

палива, деревини та іншої органіки [19]. Дрібні та наддрібні частинки перебувають у повітрі впродовж тривалого періоду часу, який може тривати від декількох тижнів до місяців. Також, тривалий час життя і маленький розмір сприяють поширенню цих частинок на території від сотень до тисяч кілометрів [20]. Концентрація у повітрі РМ усіх груп залежить від погодних умов, наявності вітру та його швидкості, стабільності атмосфери, пори доби тощо [21].

1.3. Вплив твердих частинок на організм

Вплив забрудненого повітря на стан організму людини та тварин широко досліджувався впродовж останніх десятиліть. Проте, не заважаючи на відмінності у кількісному та якісному складі забрудненого повітря, а також варіації у складі локальної атмосфери, основні показники та особливості як гострого, так і хронічного впливу забрудненого повітря на живі організми залишаються мало вивченими [23]. За даними ВООЗ, забруднення повітря є причиною 9% смертей щороку, з яких 82% припадає на хронічні та гострі захворювання дихальної та серцево-судинної системи [24]. Такий розподіл не випадковий, оскільки існує залежність між розміром частинок та їхньою здатністю проникати в організм. Більші за розміром РМ (РМ₁₀, >РМ₁₀) переважно осідають у верхніх дихальних шляхах, оскільки не здатні проникати крізь стінки альвеол. Менші частинки можуть проникати у нижчі відділи дихальної системи, а також осідати у будь-якій частині бронхіального дерева. Більш того, РМ_{2,5} здатні потрапляти у легеневі капіляри крізь респіраторний ендотелій і транспортуватися кровеносними судинами до багатьох органів та тканин [25]. Окрім інгаляційного способу, РМ також можуть потрапляти у кровообіг через нюховий епітелій, а також безпосередньо до ШКТ шляхом мукоциліарного кліренсу [26].

Мукоциліарний кліренс – це важливий фізіологічний захисний механізм, опосередкований діяльністю основних дихальних шляхів та епітеліальних клітин підслизових залоз, який бере участь у процесах видалення сторонніх частинок із дихальних шляхів назовні [27]. Мукоциліарний апарат здатен видаляти патогени, в тому числі й РМ, за допомогою механічної дії війок і рефлекторного відкашлювання. Підслизові залози можуть додатково секретувати різного роду електроліти, протизапальні білки та слиз для полегшення виведення подразника та мінімізації травмування власних тканин [28]. Проте, частина РМ, яка потрапляє із легенів до ротової порожнини шляхом мукоциліарного кліренсу, може зі слиною потрапляти до ШКТ. Дані досліджень підтвердили наявність РМ у загальному кров'яному руслі уже на 6 годині після вдихання [29]. Більш того, їх можна було виявити у печінці, атеросклеротичних бляшках аорти, нирках, товстій кишці та навіть головному мозку обстежуваних впродовж 3 місяців із початку експерименту (рис. 1.2) [30, 31].

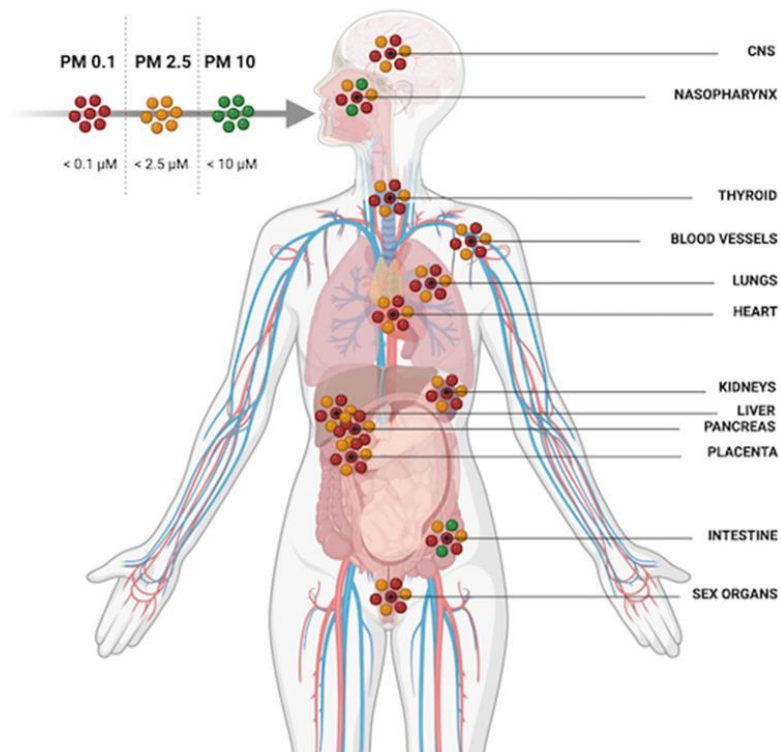


Рис. 1.2. Проникна здатність основних груп твердих частинок у різні тканини та органи [30]

Токсичність та патофізіологічні механізми різних видів РМ різняться. Так, РМ можуть бути мутагенами, здатними викликати окисне пошкодження макромолекул, активувати каскади запальних процесів, індукувати загибель клітин тощо [32]. Пошкодження клітин на молекулярному рівні, в тому числі мітохондрій та ДНК, призводить до активації сигнальних шляхів апоптозу. Наявність у складі РМ металів, особливо заліза, сприяє підвищенню активності таких ферментів, як супероксиддисмутаза та глутатіонпероксидаза, що здатне призводити до фероптозу [33]. РМ_{2,5} можуть активувати цитокін-залежні шляхи аутофагії, передаючи сигнали через toll-подібні рецептори, шляхом трансдукції сигналу Янус-кіназ, JAK-STAT шляхом активації транскрипції, а також через мітохондріальну циклооксигеназу 2 та простагландин Е-синтазу [34]. За дії РМ різного розміру та походження спостерігаються підвищені тканинні рівні С-реактивного білка, фактора некрозу пухлини- α , інтерлейкінів 1, 6 та 8 [35].

Висока проникна здатність та можливість транспортування до багатьох органів та тканин зумовила і велику кількість захворювань, спричинених РМ. Дихальна система, зокрема легені, є головним місцем РМ-викликаних патологій, оскільки більша частина цих частинок фільтрується та осідає саме у цьому органі [36]. Так, було показано, що збільшення концентрації РМ₁₀ у навколишньому середовищі на 10 мкг/м³ зумовлює збільшення смертності від респіраторних захворювань на 0,6%, а аналогічне зростання концентрації РМ_{2,5} зумовлює збільшення госпіталізованих людей зі скаргами на респіраторні ускладнення на 2% [37]. До захворювань дихальної системи, викликаних РМ, можна віднести астму, хронічне обструктивне захворювання легень, інтерстиціальне ураження легень, рак, ідіопатичний фіброз, зниження життєвої ємності легень тощо [38].

Рівень забруднення повітря також корелює із підвищеним ризиком розвитку серцево-судинних захворювань [39]. З впливом РМ_{2,5} асоціюють вищу імовірність виникнення серцевого нападу, серцевої недостатності,

ішемічної хвороби серця, інсульту, атеросклерозу, аритмії, гіпертензії різної етіології [40]. Також РМ здатні викликати підвищення систолічного артеріального тиску та концентрації ендотеліну-1 у плазмі крові, що є маркером атеросклерозу [41]. Більш того, виявлена кореляція між вмістом наночастинок вугілля у повітрі та імовірності виникнення порушень функціонування ендотелію [42].

Не зважаючи на те, що РМ більшою мірою вражають дихальну та серцево-судинну системи, вони також мають негативний вплив і на ШКТ. Так, щороку зростає кількість досліджень, які підтверджують шкідливий вплив РМ на роботу травної системи. Дані досліджень показують, що підвищена концентрація РМ здатна викликати у мишей запалення різних частин кишківника, знижувати його проникність, змінювати кількісний та якісний склад мікробіоти, а також збільшувати експресію прозапальних цитокінів, що свідчить про розвиток оксидативного стресу [43]. Більш того, РМ-індукована ініціація імунної відповіді, активація імунних клітин та наявність запальних цитокінів може призвести до додаткового пошкодження епітеліального бар'єра ШКТ та зробити його більш вразливим до токсичних частинок [44]. Негативний вплив РМ на кишківник проявляється також і у тому, що деякі бактерії здатні метаболізувати частинки з утворенням активних форм кисню. Таким чином, забруднення повітря зсуває окисно-відновну рівновагу клітин ШКТ у сторону окислення, що сприяє розвитку низки запальних захворювань, таких як коліт, синдром подразненого кишечника, хвороба Крона та інші [45]. Також існують дані щодо зв'язку РМ_{2,5} із розвитком ожиріння та діабету у людини [46].

Підвищена концентрація РМ у навколишньому середовищі позитивно корелює із рівнем захворюваності на низку нейродегенеративних захворювань, таких, наприклад, як хвороба Альцгеймера, ХП, розсіяний склероз тощо [47]. Так, було показано, що довготривалий вплив РМ_{2,5} значно підвищував рівень смертності та госпіталізації пацієнтів із ХП, хворобою Альцгеймера та деменціями, не пов'язаними із хворобою

Альцгеймера [48]. Вплив PM_{2,5} зумовлює зниження рівня уваги, запам'ятовування та здатності до навчання, а також сприяє атрофії сірої речовини в деяких ділянках головного мозку [49]. Дослідження PM сажі, нітратів, сульфатів, морської солі та ґрунту показали позитивну кореляцію із випадками госпіталізації пацієнтів на початкових стадіях ХП. Так, з кожним збільшенням стандартного відхилення вмісту нітрат-вмісних PM ризик госпіталізації збільшувався в 1,06 рази [50]. Проникаючи в організм, PM_{2,5} знижує експресію нервовою системою білків щільного з'єднання, *zonula occludens 1* та *2*, що призводить до порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єра, і, як результат, сприяє інфільтрації макрофагів у нервову тканину [51].

Надрібні частинки, такі як PM_{0,1}, можуть проникати через гематоенцефалічний бар'єр і викликати окисне пошкодження тканин, глутаматергічну ексайтотоксичність, а також активацію мікроглії. PM_{0,1} були виявлені в нейронах, глії, ендотелії, епендимальних клітинах судинного сплетення, цереброспінальній рідині, епітелії носової порожнини та нюховому епітелії осіб, які зазнали впливу PM [52].

1.4. Виразковий коліт

Виразковий коліт – це запальне захворювання ШКТ, яке характеризується рецидивуючим запаленням слизової оболонки дистальних ділянок товстої кишки, яке здатне поширюватися у проксимальному напрямку. Це захворювання може бути гострим або хронічним, перебігати із різним ступенем тяжкості, а періоди ремісії чергуються із рецидивами, деколи навіть переростаючи у фульмінантну хворобу [53]. Щороку реєструється близько 150-300 нових випадків захворювання на 100 000 населення. Також, відсоток людей, що страждають на ВК, зростає, а піки

захворюваності припадають на 25-35 та 60-75 років [54]. Не зважаючи на високу захворюваність, смертність асоційована із ВК є низькою [55].

Етіологія та механізми розвитку ВК можуть бути різноманітними. Так, у дорослих осіб коліт може бути наслідком загальних інфекційних захворювань, запальних захворювань ШКТ іншої етіології, наприклад, хвороби Крона, вживання певних ліків, ішемії, впливу радіації тощо. Коліт також може викликатися різними збудниками, наприклад, бактеріями *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Mycobacterium tuberculosis* і *Clostridium difficile*. Невелика частина випадків захворювання припадає на вірусні коліти, спричинені цитомегаловірусами [56].

Не зважаючи на різноманітну етіологію, клінічні прояви ВК, зазвичай, є схожими. Так, характерними симптомами коліту є кров'яниста діарея, біль у животі, новоутворення у черевній порожнині, тенезми, гарячка, гранулеми, загальна втома та сонливість [57]. Симптоми ВК можуть відрізнятися у залежності від тяжкості й стадії перебігу захворювання, а також від місця його виникнення. До інших симптомів коліту можуть належати біль у животі та спазми, ректальний біль, часті позиви до дефекації, прогресуюча втрата ваги та лихоманка. У дітей з ВК також можуть спостерігатися порушення росту. Більшість людей, які страждають на коліт, мають симптоми легкої або помірної тяжкості [58]. Окрім шлунково-кишкових симптомів, пацієнти з ВК також часто страждають на депресію, мають підвищений рівень тривожності та у деяких випадках навіть порушення соціальної поведінки. Тривалий ВК асоціюється з підвищеним ризиком дисплазії та колоректального раку [59].

Оскільки у більшості випадків ВК є спорадичним, його зазвичай класифікують за місцем локалізації. Так, коліт можна поділити на виразковий проктит, проктосигмоїдит, лівобічний коліт та панколіт. При виразковому проктиті запалення обмежується товстою кишкою, а симптоми включають діарею та спазми помірної тяжкості. Проктосигмоїдит охоплює пряму кишку та сигмоподібну кишку. До симптомів проктосигмоїдиту належать кров'яниста діарея, спазми у нижніх відділах живота, біль, а також тяжкість

або неможливість випорожнення. Лівобічний коліт – це вид коліту, при якому запалення ШКТ поширюється від дистального відділу прямої кишки через сигмопобіну кишку до ободової. Симптоми включають криваву діарею, спазми в животі та біль переважно з лівого боку, лихоманку тощо. При панколіті спостерігається запалення усіх відділів товстої кишки. Цей тип коліту має найтяжчий перебіг та симптоматику, яка включає часті позови та криваву діарею, спазми, біль, дискомфорт, виникнення новоутворень, лихоманку та значну втрату ваги. ВК також може додатково вражати колоректальну зону, або поширюватися на термінальний відділ клубової кишки [60].

1.5. Хвороба Паркінсона

Хвороба Паркінсона (ХП) – це повільно прогресуюче нейродегенеративне захворювання, яке у більшості випадків має клінічні прояви у людей після 65-років. Після хвороби Альцгеймера, хвороба Паркінсона є другим за поширеністю у світі нейродегенеративним захворюванням. У країнах з високим рівнем доходу середня річна захворюваність на ХП становить 160 осіб на 100 000 населення [61]. Характерною особливістю ХП є загибель дофамінергічних (ДА) нейронів у SNpc середнього мозку. Зниження дофаміну у базальних гангліях ЦНС призводить до виникнення класичних моторних симптомів, таких, як тремор, брадикінезія, акінезія та ригідність [62].

1.5.1. Етіологія хвороби Паркінсона

Не зважаючи на велику зацікавленість наукової спільноти у вивченні етіології ХП, точні причини її виникнення у більшості випадків і досі

залишаються невідомими. Проте, було виявлено ряд генетичних факторів, а також і факторів навколишнього середовища, які здатні викликати розвиток ХП [63].

Нелінійність прогресування та виникнення моторних і немоторних симптомів ХП пов'язана з мутацією гена SNCA (*Synuclein alpha gene*). Наявність цієї мутації зумовлює ранній розвиток захворювання та його стрімке прогресування. Мутація гена SNCA може бути точковою, дуплікативною, або триплікативною. У залежності від кількості локусів цього гена залежить те, наскільки рано з'являться перші симптоми хвороби, а також наскільки складним буде її перебіг [68]. Мутація гена GBA1, який кодує β -глюкоцереброзидазу – лізосомний фермент, відповідальний за гідроліз глюкоцереброзидів, зумовлює найбільшу кількість спадкових випадків захворюваності на ХП. До інших генетичних факторів ризику належать також гени II класу головного комплексу гістосумісності (HLA-DQB1) та ген, що кодує τ -білок – MAPP [69, 70].

За даними сучасних досліджень, генетичні причини виникнення ХП становлять лише 5% з усіх можливих [71]. Так, було відкрито низку генів, що потенційно здатні зумовлювати ХП. Вони отримали назву "PARK" та порядковий номер, який відповідає черговості їхнього відкриття [64]. Станом на сьогодні було ідентифіковано 23 таких гени, з яких роль у розвитку ХП остаточно підтверджена для шести (PARK5, PARK11, PARK13, PARK18, PARK21 та PARK23), а решта вважається потенційними факторами ризику (PARK3, PARK10, PARK12, PARK16 та PARK22) [65]. За типом успадкування мутації в генах PARK можуть бути або автосомно-домінантними (наприклад, SCNA, LRRK2 та VPS32), або автосомно-рецесивними (наприклад, PRKN, PINK1 та DJ-1). До перших належить мутації у гені збагаченої лейцином кінази (LRRK2), які у деяких популяціях викликають до 40% випадків розвитку ХП, проте в інших популяціях є досить рідкісними [66]. До мутацій LRRK2, які здатні викликати ХП належать чотири точкові мутації, дуплікація або триплікація даного гену.

Найчастіше зустрічається мутація p.G2019S, яка зумовлює до 1% спорадичних та до 4% спадкових форм ХП [67].

До факторів навколишнього середовища, які здатні зумовлювати розвиток ХП, належать вживання алкоголю, кофеїну, паління, високий рівень уратів в організмі, травми головного мозку, споживання молочних продуктів, метамфетаміну та інших наркотичних речовин, дія гербіцидів, пестицидів, інсектицидів на організм, наявність інших тяжких хвороб, таких як рак, діабет тощо [72].

1.5.2. Симптоми хвороби Паркінсона

Клінічні симптоми ХП зазвичай визначаються моторними порушеннями, проте існують також і порушення інших систем та функцій організму, які не пов'язані з рухом. Тому симптоми ХП поділяють на моторні та немоторні симптоми [73].

Моторні симптоми ХП присутні у всіх випадках і є ключовими для діагностики захворювання. Зазвичай, вони з'являються набагато пізніше, ніж НМС і свідчать про прогресування хвороби. Розвиток моторних симптомів пов'язаний із гальмуванням таламуса та зниженням збуджувального впливу на базальні ганглії та моторну кору. Вони виникають у зв'язку зі зниженим рівнем дофаміну в SNpc та у смугастому тілі. Як наслідок, спостерігаються порушення у процесах кортикальної активації м'язів. Основними моторними симптомами ХП є складнощі із підтриманням пози, тремор у стані спокою, жорсткість м'язів, акінезія та брадикінезія. У багатьох випадках додатково спостерігається слабкість у м'язах, пов'язана з брадикінезією. Ці два симптоми нерідко з'являються одночасно, оскільки їх виникнення зумовлюється спільними патофізіологічними механізмами. Пацієнти з ХП також страждають від труднощів розпочати та закінчити певний рух, ригідності, зниження тону м'язів обличчя. Моторні симптоми з часом лише

прогресують та ускладнюються: збільшується частота виникнення, тривалість та місце їх локалізації [74].

Більшість НМС були описані Джеймсом Паркінсоном в оригінальному трактаті про розлад [75], що тепер має його ім'я. До найпоширеніших НМС належать розлади ШКТ, та сечовидільної системи, виснаження, порушення сну, тривожність, депресія, біль тощо. Станом на сьогодні, зросла роль саме НМС у діагностиці та вивченні ХП, оскільки вони з'являються задовго до виникнення моторних симптомів, а також завдають більше дискомфорту пацієнтам з ХП. НМС присутні у всіх пацієнтів з чітко вираженими моторними симптомами. Найчастіше НМС проявляються у періоди, коли послаблюються моторні симптоми, особливо така тенденція справджується для поведінкових НМС. Проте НМС часто нехтують при лікуванні ХП, оскільки пацієнти у більшості випадків не пов'язують їх з розвитком ХП [76]. Дані досліджень показують, що серед людей, які страждали на ХП, лише 28% пацієнтів з середньою та важкою формами депресії, 2% з порушеннями фази швидкого сну (REM sleep), 13% з серйозними проблемами сечовипускання та 3% чоловіків з еректильною дисфункцією отримували медикаментозне лікування цих симптомів при ХП [77].

1.5.3. Порушення з боку шлунково-кишкового тракту при хворобі Паркінсона

Не зважаючи на те, що визначальними симптомами ХП є саме моторні симптоми, пацієнти також часто страждають від розладів ШКТ. Дисфункції роботи шлунку та кишечника можуть виникнути на будь-якому етапі розвитку ХП, а деякі із симптомів можуть з'явитися за багато років до діагностування хвороби [78].

Численні дані показують, що при ХП порушується нормальне функціонування осі «кишечник-мозок», що свідчить про те, що вона грає

важливу роль у розвитку патофізіологічних процесів при ХП [79]. Зокрема, кишкова мікробіота, до складу якої входить велика кількість видів мікроорганізмів, відіграє ключову роль у формуванні кишкового бар'єра та підтриманні його функціонування, метаболізмі, забезпеченні імунітету та нормальної діяльності ЦНС. Доклінічні та клінічні дослідження показали, що існує тісний зв'язок між змінами у складі мікробіоти кишечника та розвитком неврологічних та нейродегенеративних хвороб, таких як ХП. Цей висновок стає очевидним, якщо звернути увагу на те, що кишкова мікробіота здатна впливати на розвиток нервової системи шляхом зміни експресії нейротропних факторів, деяких субодиниць NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) рецепторів, регулювати проникність гематоенцефалічного бар'єра та процеси мієлінізації у головному мозку. Поширеною концепцією є те, що ХП викликається певним нейротропним чинником, який продукується мікробіотою кишечника та поширюється в ЦНС шляхом антероградного транспорту через блукаючий нерв, досягаючи задніх моторних ядер цього нерва, а вже потім SNpc середнього мозку. Проте не варто упускати той факт, що вісь «кишечник-мозок» є двосторонньою, і як ШКТ може впливати на ЦНС, так і ЦНС може викликати зміни у функціонуванні ШКТ [80].

Окрім мікробіоти, важливу роль в розвитку ХП відіграють кишкові гліальні клітини (*enteric glial cells*, EGCs). Вони являють собою клітини периферійної нейроглії, локалізовані в аурбахівському та підслизових плетивах периферичної нервової системи. Традиційно вважається, що EGCs виконують трофічну та структурну функції, підтримуючи нейрони інтрамуральних сплетень кишківника. Проте, вони необхідні також для регулювання широкого спектра функцій ШКТ, наприклад, моторики кишечника, всмоктувальної функції ентероцитів, підтримання цілісності слизового бар'єра, забезпечення взаємодій між нейронами, імунними та епітеліальними клітинами ШКТ тощо. Таким чином, запалення цих клітин призводить до порушення вищезазначених процесів, викликаючи різного роду шлунково-кишкові розлади [81].

Шлунково-кишкові розлади при ХП можуть з'являтися у різних формах, включаючи дисфагію, гастропарез, закрепи, порушення моторики ШКТ та інші. До них також належить зниження частоти та ефективності ковтання, яке може призвести до більш серйозних проблем, як-от задуха, недоїдання/мальнутриція та прогресуюча втрата ваги. Важливим симптомом ХП є порушення прохідності шлунку. У хворих, які страждають гастропарезом, може спостерігатися раннє настання ситості, зниження апетиту, здуття живота, нудота, блювання тощо. Також це може спричинювати погіршення моторних симптомів, викликане неможливістю абсорбції леводопи, оскільки цей препарат всмоктується ентероцитами тонкої кишки, а вже потім проникає в кров. Функція товстої кишки також порушується при ХП. Зміни бактеріальної мікробіоти товстої кишки: її кількості, видового складу та відсоткового співвідношення між організмами, є раннім маркером розвитку ХП. Зниження рухової моторики кишечника, і, як наслідок, уповільнений транзит через нього фекальних мас, є наслідком запалення та втрати EGCs. Дисфункція дефекації також обумовлена зниженою активністю м'язів анального сфінктера та нездатністю ректальних м'язів належним чином розслаблятися, щоб полегшити випорожнення. Це призводить до кишкової непрохідності та частих закрепів у пацієнтів [82].

Закрепи є найпоширенішими симптомами з боку ШКТ при ХП, з'являючись у 80-90% випадків. Вони є класичними премоторними симптомами, які виникають у зв'язку з порушеннями кишкового транзиту та дисфункцією дефекації. Хронічні закрепи негативно позначаються на повсякденному житті пацієнта, перешкоджають ефективній абсорбції антипаркінсонічних препаратів та впливають на розвиток моторних симптомів. З прогресуванням хвороби, вражаються нейрони, які проєктуються з паравентрикулярного ядра гіпоталамуса до заднього моторного ядра блукаючого нерва, що порушує парасимпатичний контроль моторики кишечника. Більш того, піддаються дегенерації нейрони аурбахівського та підслизових гангліїв. У близько 70% пацієнтів з ХП

спостерігаються включення α -синуклеїну у тільцях Леві. Варто зазначити, що у таких пацієнтів хронічні закрепи зустрічаються частіше та викликають більше складностей, ніж у пацієнтів з ХП без утворення тілець Леві. Деякі антипаркінсонічні препарати також можуть ускладнювати проблему закрепів у пацієнтів, що їх приймають. Ускладнення акту дефекації спричинене підвищеним тонусом м'язів тазового дна, ректальних м'язів та м'язів анального сфінктера [83, 84].

1.5.4. Моделі хвороби Паркінсона

Аналіз історії хвороби пацієнтів, у яких було діагностовано ХП, не є достатнім для вивчення такого комплексного та багатосистемного захворювання, як ХП. Тому, було розроблено експериментальні моделі ХП, які здатні відтворювати основні симптоми хвороби та зумовлювати розвиток патологічних процесів, що відбуваються на різних стадіях захворювання. Експериментальні моделі ХП реалізуються на лабораторних тваринах, а саме мишах, щурах, деяких приматах тощо [85]. За способом індукування ХП, експериментальні моделі хвороби можна поділити на моделі, індуковані хімічними речовинами, моделі нейрозапалення, а також генетичні та фармакологічні моделі [86].

Генетичні моделі ХП є менш поширеними, оскільки у більшості випадків захворювання розвивається спорадично. Проте, невеликий відсоток усіх випадків ХП припадає на генетичні фактори, тому для їх вивчення створюють лінії трансгенних тварин із мутаціями у PARK genaх. Найчастіше це моногенні форми ХП, які викликаються мутаціями у genaх LRRK2, SNCA, PINK₁, UCH-L₁, паркіну тощо. Більшість таких моделей не зумовлюють значну дегенерацію ДА нейронів у SNpc, а отже і не забезпечують виникнення моторних симптомів. Тому, на додачу до класичних трансгенних моделей також були розроблені адено-асоційовані вірусні вектори, які

використовують для посиленої експресії різних факторів, що здатні викликати розвиток ХП. Такі моделі здатні зумовлювати дегенерацію ДА нейронів SNpc, формування α -синуклеїнових комплексів, виникнення моторних порушень тощо [87].

Моделі ХП, індуковані хімічними речовинами, найчастіше застосовуються у лабораторних дослідженнях, оскільки вони здатні відтворити головні клітинні та системні процеси, які відбуваються при ХП, наприклад нейродегенерацію, нейрозапалення, ОС, накопичення α -синуклеїнових бляшок, моторні та немоторні симптоми хвороби тощо [88]. Моделі ХП, індуковані хімічними речовинами, передбачають введення лабораторним тваринам різних нейротоксинів, здатних індукувати розвиток ХП, або відтворювати певні симптоми захворювання. До речовин, здатних зумовлювати розвиток ХП, належать 6-гідроксидофамін (6-OHDA) – аналог дофаміну та норепінефрину, МРТР (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин) – попередник токсичного для ДА нейронів MPP⁺ (1-метил-4-феніл-2,3-дигідропіридин іон), гербіцид паракват (1,1-диметил-4,4-дипіридиндихорид), пестицид ротенон, ВМАА (β -Methylamino-L-alanine) тощо [89]. Більшість цих речовин діє шляхом інгібування мітохондріального комплексу I (НАДН-дегідрогеназний комплекс), що призводить до зниження або повного припинення продукції АТФ клітинами, порушення потоку електронів у ЕТЛ, продукції активних форм кисню і розвитку ОС. Більш того, деякі нейротоксини, зокрема паракват, здатні генерувати АФК у процесах свого метаболізму. Здатність рекапітулювати особливості ХП також залежить і від способу введення речовини, дозування та виду лабораторних тварин, за участю яких проводиться дослідження. Варто зазначити, що жодна із експериментальних моделей ХП не здатна повністю відтворити усі патофізіологічні механізми ХП, включаючи агрегацію α -синуклеїну, утворення тілець Леві, дегенерацію ДА нейронів у SNpc і стріатумі та розвиток моторних та немоторних порушень [90].

Поширеними є і моделі нейрозапалення, оскільки запальні процеси відіграють значну роль у патогенезі ХП. Для моделювання ХП найчастіше використовується поліінозинова:поліцитидинова кислота (poly(I:C)), а також ліпополісахарид (ЛПС) – компонент клітинної стінки грам-негативних бактерій [91]. Обидві речовини є потужними активаторами клітин мікроглії та астроцитів, які через TLR-3 та TLR-4 рецептори зумовлюють розвиток імунної відповіді та сприяють продукції різних прозапальних хемокінів, цитокінів та оксидативних факторів, наприклад інтерлейкін-6 (IL-6), інтерлейкін-1 β (IL-1 β), фактор некрозу пухлин α (TNF- α), NO, супероксид (O₂⁻) тощо [92]. Астроцити при цьому виступають посилювачами імунної відповіді, які додатково продукують прозапальні фактори і зумовлюють дегенерацію ДА нейронів [93]. Адміністрація 10 мкг ЛПС щурам у зону SNpc здатна зумовлювати дегенерацію 50-80% тироксингідроксилаза-позитивних клітин впродовж 4 тижнів [94]. Також, ЛПС здатен зумовлювати виникнення моторних порушень у щурів [95], збільшувати проникність епітелію ШКТ, а також впливати на моторику шлунку та кишечника, особливо товстої кишки [96].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви та матеріали

У роботі були використані: розчин Кребса-Рінгера («Sigma-Aldrich», Німеччина), 6% йодоацетамід («Sigma-Aldrich», Німеччина), метилцелюлоза («Sigma-Aldrich», Німеччина), хлорид калію («Sigma-Aldrich», Німеччина), маніт, глюкоза, карбахолін («Sigma-Aldrich», Німеччина), натрій хлорид («Sigma-Aldrich», Німеччина), 0,4% розчин фарби Еванс синій («Sigma-Aldrich», Німеччина), уретан («Sigma-Aldrich», США), формаїд, N-ацетил-1-цистеїну («Sandoz», Швейцарія), розчин КОН у 70%-й етанолі («Sigma-Aldrich», Німеччина), апоморфін гідрохлорид («Sigma-Aldrich», США), періодатна кислота («Sigma-Aldrich», Німеччина), реактив Шифа («Sigma-Aldrich», Німеччина), 0,6% метабісульфіт натрію («Sigma-Aldrich», Німеччина), НТАВ (гексадецилтриметиламоній бромід) буфер («Sigma-Aldrich», Німеччина), інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. («Хімлаборреактив», Україна). Зразок препарату із частинками забруднювачами повітря природного походження, а саме горіння деревини тополі, був синтезований та наданий відділом нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом проф., д.б.н. Борисової Т.О.

2.2. Експериментальні тварини

Дослід проводився на 72 білих лабораторних нелінійних щурах-самцях масою 170-200 г для моделювання коліту (n = 52) та 200-220 г для моделювання ХП (n = 20). Тварин утримували у віварії ННЦ «Інститут біології та медицини» у відповідності до норм, встановлених законом

України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 №3447-IV, за стандартних умов та раціону харчування: температурний режим – 21-23 °С, цикл освітлення-темрява – 12/12 год, вологість – 30-35%, повноцінний корм для лабораторних тварин К-12-4 та вільний доступ до води. Проведення експериментів здійснювали згідно вимог біоетичної комісії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

2.3. Схема експерименту

Для моделювання гострого коліту тварин було розподілено на 4 групи:

I група (n = 13) – контрольна група, під час моделювання хронічного впливу РМ щурам вводили фізіологічний розчин, у об'ємі 0,3 мл перорально. Під час моделювання гострого коліту щурам вводили 0,3 мл метилцелюлози ректально.

II група (n = 13) – тваринам під час моделювання хронічного впливу РМ вводили препарат РМ_С у кількості 180 мкг/100 г маси тіла тварини перорально. Під час моделювання гострого коліту щурам вводили 0,3 мл метилцелюлози ректально.

III група (n = 13) – під час моделювання хронічного впливу РМ щурам вводили фізіологічний розчин у об'ємі 0,3 мл перорально. Для моделювання гострого коліту вводили 6%-й розчин йодоацетаміду в об'ємі 0,1 мл ректально.

IV група (n = 13) – модель гострого коліту, тваринам під час моделювання хронічного впливу РМ вводили препарат РМ_С у кількості 180 мкг/100 г маси тіла тварини, для моделювання гострого коліту вводили 6%-й розчин йодоацетаміду в об'ємі 0,1 мл.

Для моделювання ЛПС-індукованої ХП тварин було розподілено на 4 групи:

I група (n = 5) – контрольна група, під час моделювання хронічного впливу РМ щурам вводили фізіологічний розчин, у об'ємі 0,3 мл перорально. Під час проведення стереотаксичної операції щурам вводили 2 мкл фізіологічного розчину у ділянку SNpc.

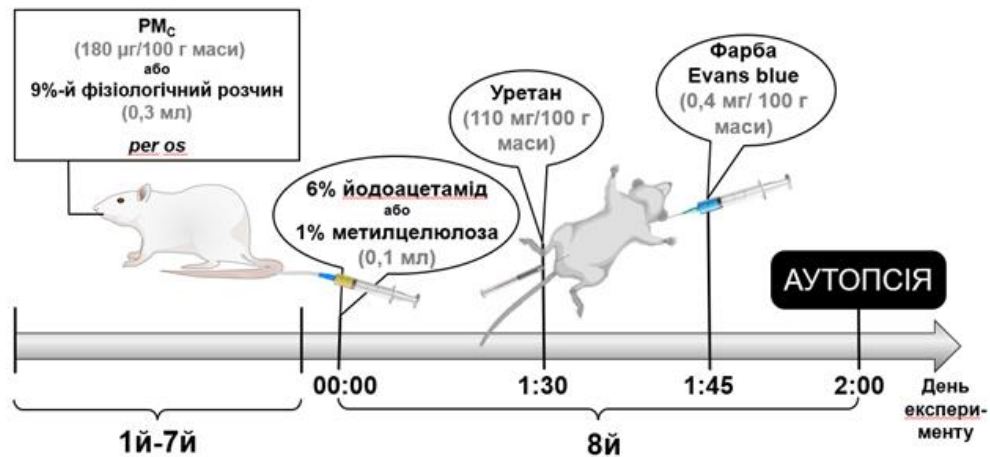
II група (n = 5) – тваринам під час моделювання хронічного впливу РМ вводили препарат РМ_С у кількості 180 мкг/100 г маси тіла тварини перорально. Під час проведення стереотаксичної операції щурам вводили 2 мкл фізіологічного розчину у ділянку SNpc.

III група (n = 5) – під час моделювання хронічного впливу РМ щурам вводили фізіологічний розчин у об'ємі 0,3 мл перорально. Під час проведення стереотаксичної операції щурам вводили 10 мкг ендотоксину ЛПС в 2,0 мкл фізіологічного розчину у ділянку SNpc.

IV група (n = 5) – модель ХП, тваринам під час моделювання хронічного впливу РМ вводили препарат РМ_С у кількості 180 мкг/100 г маси тіла тварини, під час проведення стереотаксичної операції щурам вводили 10 мкг ендотоксину ЛПС в 2,0 мкл фізіологічного розчину у ділянку SNpc.

Експеримент проводили згідно зі схемою (рис. 2.3.1).

А



Б

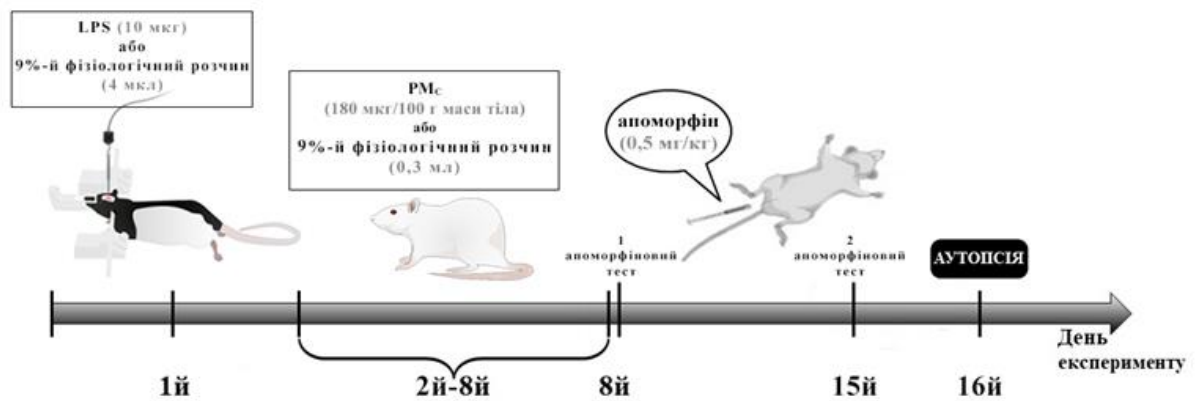


Рис. 2.3.1. Схема проведення експерименту: моделювання йодоацетамід-індукованого коліту (А), моделювання ЛПС-індукованої моделі ХП (Б)

Початком експерименту вважався перший день введення діючої або контрольної речовини.

Моделювання хронічного впливу РМ-забруднювачів повітря відбувалося впродовж перших 7 днів шляхом орального введення препарату РМ.

Для моделювання гострого коліту щурам одноразово ректально вводився 6%-й розчин йодоацетаміду в об'ємі 0,1 мл на 8-й день експерименту за 2 години до аутопсії.

Визначення ендотеліальної проникності та гліканової частини глікопротеїнів муцину товстої кишки щурів відбувалося за допомогою реакції Шифа на 8-9 дні експерименту.

Визначення активності мієлопероксидази слизової оболонки товстої кишки та ендотеліальної проникності товстої кишки проводилося методом спектрофотометрії на 8-й день після початку експерименту.

Визначення кількості зруйнованих ДА нейронів за допомогою апоморфінового тесту проводилося на 8-й та на 15-й дні експерименту.

Вимірювання маси тіла щурів, маси товстої кишки, а також маси тимусу, цекуму та селезінки проводилися на 8-й день експерименту.

Вимірювання відсоткового вмісту води у фекаліях тварин проводилося на 9-й день експерименту.

Для визначення бар'єрних характеристик товстої кишки щурів проводилася реєстрація електрофізіологічних параметрів органу у камері Уссінга.

Виводили тварин з експерименту на 8-й день за допомогою інгаляції CO₂ з подальшою цервікальною дислокацією.

2.4. Моделювання хронічного впливу наночастинок диму

Для моделювання хронічного впливу наночастинок диму щурам вводили зразок препарату із РМ природного походження, а саме горіння деревини тополі, пероральним шляхом у розрахунку 180 мкг/100 г маси тіла тварини. Препарат РМ_с вводився один раз на день впродовж 7 днів. Тваринам контрольної групи замість препарату наночастинок вводився 9%-й фізіологічний розчин *per os* у кількості 0,3 мл. Речовини вводилися у один і той самий проміжок часу впродовж всього періоду.

2.5. Моделювання експериментального коліту

Для моделювання гострого коліту щурам одноразово вводили йодоацетамід («Sigma-Aldrich», Німеччина) шляхом ректального введення. Йодоацетамід розчиняли у 5 мл 1%-у розчині метилцелюлози у дозі 0,3 г та вводили тваринам у кількості 0,1 мл [97]. Щурам контрольної групи вводили 1%-й розчин метилцелюлози у такій же кількості. Речовини вводили на відстані 7 сантиметрів від анального отвору за допомогою гумового катетеру S8 (Rüsch, Німеччина).

2.6. Визначення ендотеліальної проникності товстої кишки

Для визначення проникності ендотелію товстої кишки, щурів анестезували уретаном («Sigma-Aldrich», США), шляхом інтраперитонеального введення у кількості 1,1 г/кг. Після цього, у яремну вену тварин вводили 0,4%-й розчин фарби Еванс синій (ЕВ) у кількості 0,4 мг/100 г маси тіла тварини за 15 хв до аутопсії [98]. Ділянку товстої кишки довжиною 7 см видаляли, знімали з неї слиз та поміщали у формахід. Зразок інкубували впродовж доби на шейкері при $T=50^{\circ}\text{C}$. Оптичну густину зразка вимірювали за надосадом на спектрофотометрі при довжині хвилі 612 нм. Для контролю використовували формахід. Проникність ендотелію товстої кишки визначали за кількістю фарби в крові (мкг/г кишки).

2.7. Визначення глікопротеїнів слизу методом реакції Шифа на ПВДФ мембрані

Визначення гліканової частини глікопротеїнів муцину товстої кишки щурів відбувалося за допомогою реакції Шифа. Для цього з товстої кишки

тварин, вилученої під час аутопсії, було вирізано фрагмент розміром 1 см, та поміщено у пробірки з 3 мл N-ацетил-1-цистеїном («Sandoz», Швейцарія). Кожен зразок піддавався перемішуванню на вортексі впродовж 4 хв та центрифугуванню впродовж 15 хв при прискоренні 3000 g. Після цього з пробірок відбирали надосад та залишали осад із невеликою кількістю надосадової рідини, загальним об'ємом у 1 мл. Далі, вміст пробірок піддавався ресуспендуванню та гомогенізації. Зазначені маніпуляції проводилися на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (ІКА, Німеччина) впродовж 20 с при швидкості 20500 обертів за хвилину.

Визначення гліканової частини глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки проводилися на полівінілідендифторидній (ПВДФ) мембрані [99]. ПВДФ-мембрану послідовно занурювали на 2 хв у 100%-й та 80%-й розчин метанолу відповідно. Після цього її промивали дистильованою водою, висушували та поміщали на фільтрувальний папір. Після того, як мембрана повністю висохла, на неї наносили 10 мкл поверхневого слизу на 10-15 хв, щоб мембрана була повністю просочена зразком. ПВДФ-мембрану промивали дистильованою водою впродовж 2 хв, а після цього інкубували 10 хв у 0,5%-у розчині КОН та у 70%-у розчині етанолу і ще раз промивали дистильованою водою. Потім мембрану поміщали у 0,5%-й розчин періодатної кислоти на 10 хв, промивали дистильованою водою і піддавали дії реактиву Шифа на 30 хв при постійному струшуванні. Далі ПВДФ-мембрану двічі інкубували в 0,6%-му метабісульфіті натрію впродовж 3 хв і промивали дистильованою водою впродовж 3 хв. Після того, як мембрана повністю висохла, проводили сканування за допомогою сканера Canon PIXMA MP235. Отримані зображення опрацьовувалися та аналізувалися за допомогою програмного забезпечення для обробки та кількісного аналізу зображень Image Studio™ Lite Ver 5.0 (LI-COR Biosciences, США.) на кількість та щільність позитивно забарвлених точок.

2.8. Визначення активності мієлопероксидази слизової оболонки товстої кишки

Визначення активності мієлопероксидази (МПО) проводилося методом спектрофотометрії. Для цього 20-30 мг слизової оболонки товстої кишки дослідних щурів гомогенізувалося шляхом механічного перетирання у порцеляновій ступці з рідким азотом до утворення порошку. До отриманого гомогенізату додавали гексадецилтриметиламоній бромід буфер (НТАВ) у кількості 1 мл на 50 мг зразку. Зразок із буфером переносили у мікропробірку, яку витримували впродовж 1 хв у рідкому азоті та 10 хв на водяній бані за температури 37 °С. Після цього, пробу сонікували, попередньо зануривши її у лід, впродовж 10 секунд на ультразвуковому дезінтеграторі та центрифугували впродовж 15 хв при 14 000 rpm та +4 °С. Оптична густина зразків вимірювалася за допомогою спектрофотометра Synergy HT (BioTek Instruments, USA) при довжині хвилі 450 нм. У лунки планшета вносили по 200 мкл реакційного буфера (5*10⁻⁴ % р-н H₂O₂ – 6,1 мл, р-н ОДНС – 4,1 мл, фосфатний буфер – 4,4 мл) та по 14 мкл супернатанту досліджуваних зразків. Вимірювання проводили через 10-15 хв після внесення реагентів у лунки планшета.

2.9. Моделювання ЛПС-викликаної хвороби Паркінсона

Руйнування ДА нейронів лівої півкулі мозку проводилося шляхом одностороннього стереотаксичного введення 10 мкг ендотоксину ЛПС (*Lipopolysaccharides* з *Escherichia coli* O111:B4, cat. L2630, Sigma) в 2,0 мкл фізіологічного розчину за допомогою мікроін'єктора. Контрольній групі тварин замість ЛПС вводили 2 мкл фізіологічного розчину. Розчини готували в день операції. Щурів наркотизували сумішшю кетаміну (75 мг/кг, «Sigma», США), розведеного у фізіологічному розчині, та 2% ксилазину (100 мкл/щур,

«Alfasan International B.V», Нідерланди), який вводили інтраперитонеально у кількості 1 мл. Для ведення нейротоксину тварин поміщали у стереотакс (СЄЖ-4), модифікований для щурів. Тварин скальпували та трепанували, використовуючи наступні координати (мм) від брегми: AP (горизонтальна вісь) = -5,3; ML (сагітальна вісь) = $\pm 2,0$; DV (фронтальна вісь) = -7,2 [100]. Мікроінфузії здійснювалися зі швидкістю 1 мкл/15 с. Після введення ЛПС, мікроін'єктор залишали в мозку ще впродовж 5 хв для попередження відтоку рідини. Далі мікроін'єктор витягували та накладали шви на м'які тканини голови тварини.

2.10. Апоморфіновий тест

Визначення відсотку зруйнованих ДА нейронів проводили за допомогою ротаційного апоморфінового тесту на 1-й та 2-й тиждень експерименту (8-й і 15-й день експерименту відповідно). Для цього щурам внутрішньоочередно вводили 0,5 мг/кг апоморфін гідрохлориду («Sigma-Aldrich», США) та реєстрували кількість обертів, виконаних твариною протягом 30 хвилин. Інтенсивні циркуляторні рухи понад 180 обертів/30 хв. свідчать про дегенерацію приблизно 96% дофамінергічних нейронів. Незначна ротаційна асиметрія та невелика кількість обертів (менше 180 обертів/30 хв.), відповідно, можна співвіднести із втратою 86% ДА нейронів SNpc. Відсутність ротаційної поведінки щурів у відповідь на введення апоморфіну свідчить про менше 44% зруйнованих ДА нейронів [101].

2.11. Визначення маси тіла щурів

Вимірювання маси тіла щурів проводилися на 1-й (до початку введення речовини), а також на 8-й день експерименту до початку моделювання

гострого коліту. Для цього кожну тварину по черзі поміщали у чашу електронних вагів, попередньо пересвідчившись, що вона виставлена на «нуль». Після кожного зважування тварини значення на циферблаті обнулялося з метою запобігання отримання хибних результатів. Різницю між початковою масою тіла (1-й день) та остаточно (8-й день) перераховували у відсотках, взявши початкову масу за 100%.

2.12. Визначення загальної маси товстої кишки

Вимірювання маси товстої кишки щурів проводилися на 8-й день експерименту. Орган вилучали під час аутопсії та поміщали на електронні ваги, попередньо пересвідчившись, що вони виставлені на «нуль». Після кожного зважування значення на циферблаті обнулялося з метою запобігання отримання хибних результатів. Отриману масу кишки щурів представляли в перерахунку на 100 г маси тварини (мг/100 г тіла).

2.13. Визначення загальної маси тимусу, селезінки та цекуму

Вимірювання маси тимусу, селезінки та цекуму щурів проводилися на 8-й день експерименту. Органи вилучали під час аутопсії та поміщали на електронні ваги, попередньо пересвідчившись, що вони виставлені на «нуль». Після кожного зважування значення на циферблаті обнулялося з метою запобігання отримання хибних результатів. Отриману масу тимусу, селезінки та цекуму щурів представляли в перерахунку на 100 г маси тварини (мг/100 г тіла).

2.14. Визначення вмісту води у фекаліях

Для вимірювання вмісту води у фекаліях збирали фекалії від кожної тварини на 8-й день експерименту. Після цього визначали вологу масу фекалій шляхом зважування (m_w – wet weight, волога маса). Щоб отримати суху масу фекалій, їх поміщали у термостат на 24 години за температури 60°C (m_d – dry weight, суха маса). Відсотковий вміст води у фекаліях (W, %) визначали за різницею між їх вологою та сухою масами за такою формулою:

$$W = 100 - (m_d * 100 \% / m_w) \quad (2.1)$$

2.15. Реєстрація електрофізіологічних характеристик бар'єрної функції товстої кишки щурів у камері Уссінга

Дослідження бар'єрних характеристик товстої кишки щурів відбувалося методом реєстрації електрофізіологічних параметрів у камері Уссінга (VCC MC6; Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) [102].

Перед безпосереднім проведенням вимірювань установку калібрували без встановлення зразка тканини. Для цього камеру Уссінга заповнювали розчином Кребса-Рінгера (117 мМ NaCl, 5,9 мМ KCl, 24,8 мМ NaHCO₃, 1,2 мМ NaHPO₄*2H₂O (0,1M), 1,2 мМ MgCl₂, 2,5 мМ CaCl) та відтворювали експериментальні умови, а саме підтримували температуру розчину на рівні 37 °C, проводили постійну оксигенацію карбогеном (95% O₂, 5% CO₂), проводили компенсацію різниці потенціалів на електродах, а також компенсацію різниці потенціалів на електродах напруги та електричного опору розчину. Після завершення калібрування установку розбирали та збирали заново, проте вже із зразком тканини товстої кишки, від якої попередньо відділяли м'язевий шар, залишаючи лише слизовий та підслизовий шари. Розмір фрагментів кишки у слайдері становив 0,5 см². Кожен фрагмент кріпився на слайдер таким чином, щоб тканина одночасно

була натягнутою та цілісною. Після того, як зразки поміщалися у камеру, їхню цілісність додатково перевіряли з використанням бінокюляру. Завантажені слайдери вертикально поміщалися у спеціальний отвір між півкамерами, які постійно перфузувалися розчином Кребса-Рінгера (по 5 мл у кожній). Важливо зазначити, що мукозо-серозна орієнтація зразків була однаковою в усіх дослідах. Для підтримання осмотичної рівноваги у півкамеру, до якої була звернена апікальна сторона зразка, додавали 10мМ/л маніту, а у півкамеру, до якої була повернена латеральна сторона, – 10мМ/л глюкози. Після того, як слайдер із фрагментом товстої кишки було встановлено у камеру Уссінга, його залишали на 20 хв в установці з метою адаптації тканини до умов експерименту та стабілізації електрофізіологічних параметрів. Реєстрацію струму короткого замикання проводили за фіксації напруги на 0 мВ. Трансепітеліальну резистентність реєстрували у відповідь на імпульс струму величиною 10 мкА. Запис проводили 45 хв. На 46-й хвилині додавали 100 мкМ %-го розчину карбахоліну для дослідження Ca^{2+} -залежної секреції йонів.

2.16. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження та побудову графіків проводили за допомогою пакету програми *Prism v.9 (GraphPad Software, США)*. Для оцінки кількісних показників визначали середнє значення (M) та стандартну похибку середнього (SEM). Результати представлені у вигляді $M \pm SEM$. Перевірка на нормальність розподілу здійснювалась методом Шапіро-Уїлка. Порівняльний аналіз даних здійснювався за допомогою параметру Крускала-Уолліса або тесту one-way ANOVA з post hoc Fisher LSD test. Статистичну значущість визначали відповідно до критерію $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив довготривалого введення препарату РМ диму на анатомо-фізіологічні показники щурів

Прогресування ЗЗК та нейродегенеративних хвороб здатні зумовлювати порушення роботи імунної системи ШКТ, а також сприяти розвитку ускладнень функціонування травної системи, таких як порушення процесів всмоктування води у товстій кишці, виникнення закріпів, зміна моторики органів тощо [103]. Для перевірки цієї гіпотези було досліджено зміни загальної маси тіла щурів та маси окремих органів, а саме товстої кишки, цекуму, тимусу та селезінки. Також було оцінено відсоткові зміни вмісту води у фекаліях тварин з гострим колітом (рис. 3.1.1) та ЛПС-індукованим паркінсонізмом (рис. 3.1.2) за хронічного впливу РМ диму природного походження.

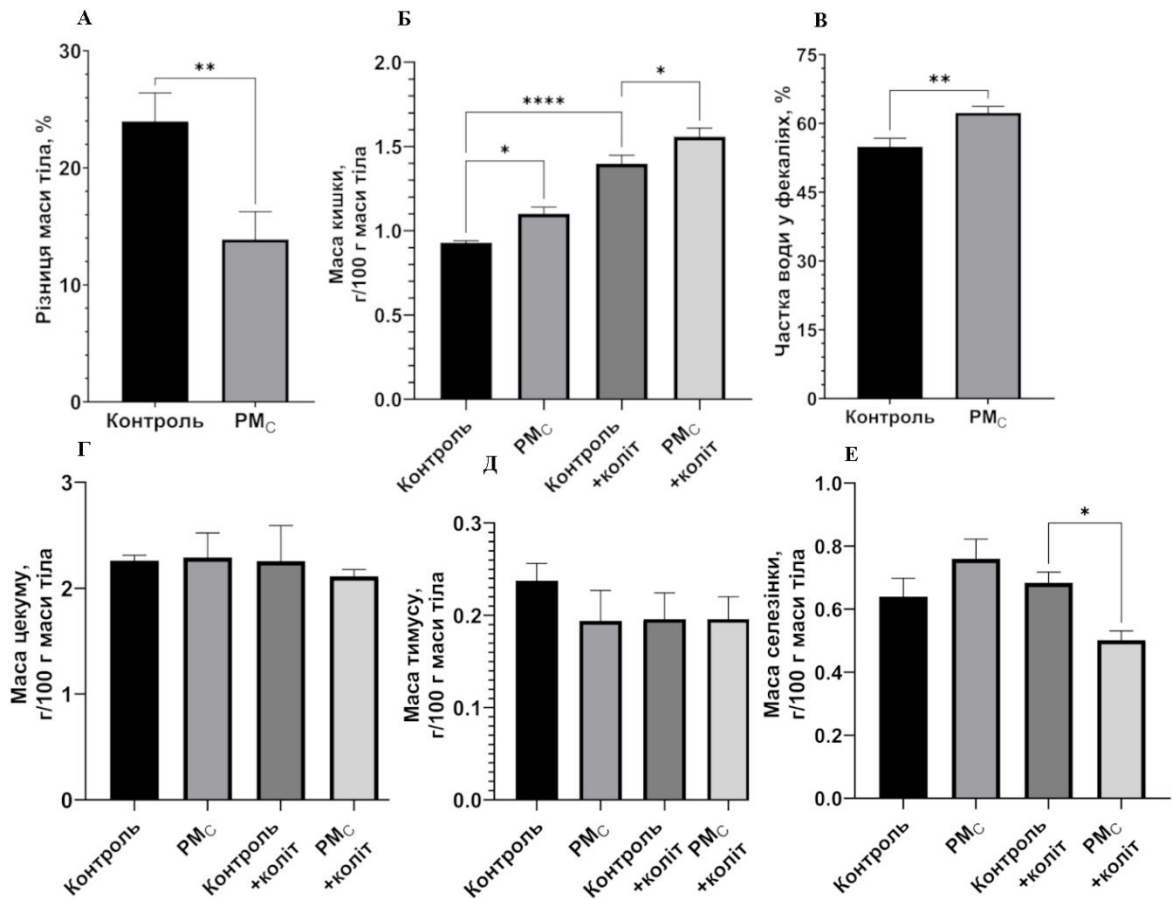


Рис. 3.1.1. Зміна анатомо-фізіологічних показників у щурів з виразковим колітом за хронічного впливу РМ_С: відсоткова різниця маси тіла (А), маса товстої кишки (Б), відсотковий вміст води у фекаліях (В), маса цекуму (Г), маса тимусу (Д), маса селезінки (Е), M±SEM, n=52;

* - p<0,05

** - p<0,01

**** - p<0,0001

За умов моделювання коліту у тварин контрольних та експериментальних груп спостерігалось збільшення маси тіла, при цьому достовірне збільшення маси тіла щурів (p<0,01) контрольних груп було на 9,8% більшим, ніж у щурів, що отримували препарат РМ_С.

У групи з модельованим колітом достовірна відмінність маси товстої кишки спостерігалася між контрольними групами (p<0,0001), а також між

контрольними групами та групами тварин, що піддавалися впливу РМ диму ($p < 0,05$).

Вміст води у фекаліях був достовірно вищим ($p < 0,01$) у щурів, що отримували препарат РМ_С, у порівнянні з контрольними групами з моделлю виразкового коліту.

За моделювання коліту, у групи щурів РМ_С+коліт відмічалось достовірне ($p < 0,05$) зменшення маси селезінки у порівнянні із контрольною групою.

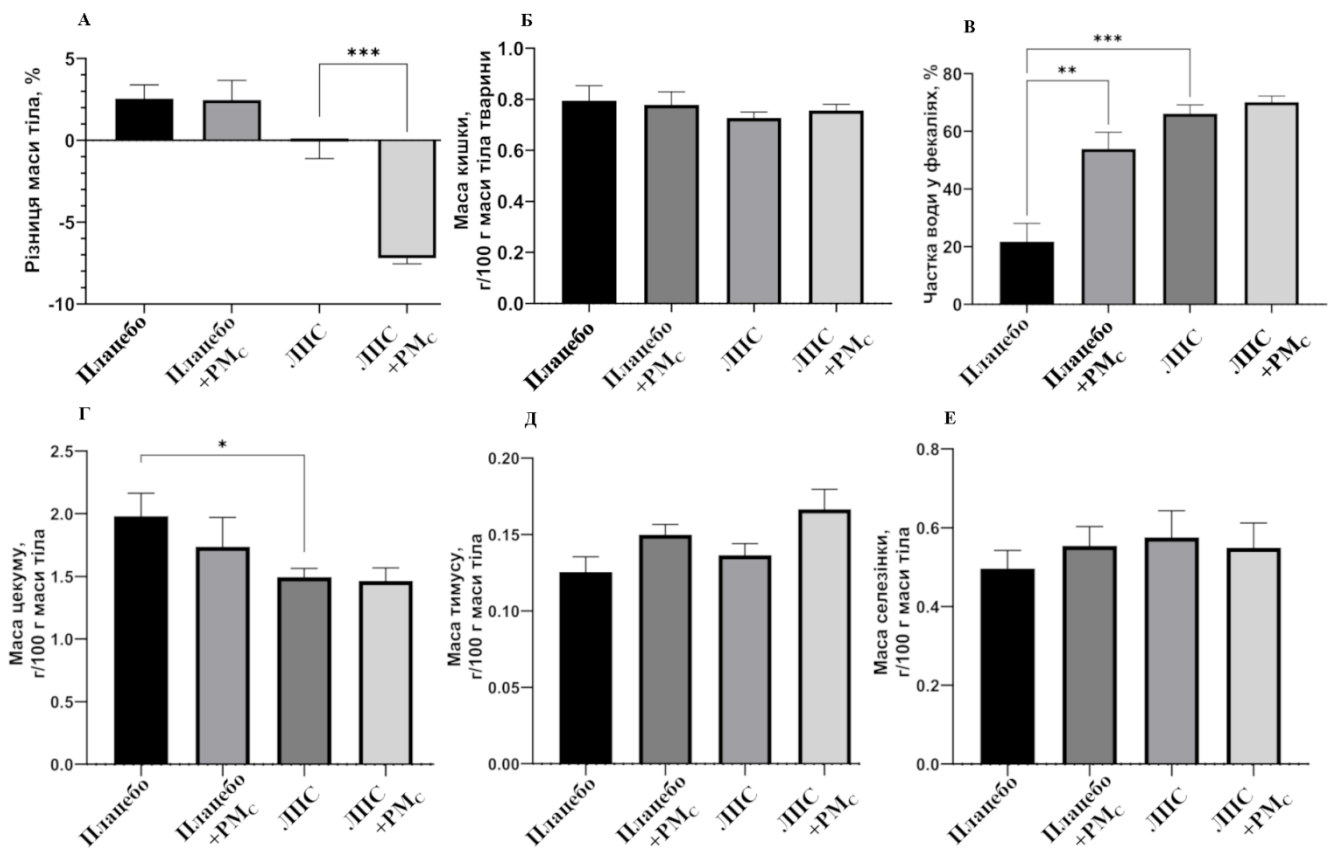


Рис. 3.1.2. Зміна анатомо-фізіологічних показників у щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом за хронічного впливу РМ_С: відсоткова різниця маси тіла (А), маса товстої кишки (Б), відсотковий вміст води у фекаліях (В), маса цекуму (Г), маса тимусу (Д), маса селезінки (Е), $M \pm SEM$, $n=20$;

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

*** - $p < 0,001$

Пероральне введення препарату РМ_С не мало впливу на масу тіла тварин із груп плацебо: як контрольна, так і експериментальна групи моделі ХП набирали вагу однаково. У щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом на відміну від групи плацебо спостерігалася достовірна втрата ваги ($p < 0,001$), яка становила 7,2% та 0,09% для паркінсоніків, що отримували препарат РМ_С та фізіологічний розчин відповідно. У групі з моделлю паркінсонізму відмінностей у масі товстої кишки не виявлено.

У щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом вміст води у фекаліях був вищим у порівнянні із контролем. Також в тварин цих груп відмічали появу діареї. У групи плацебо, якій вводили препарат РМ диму, вміст води у фекаліях також був вищим. Проте, достовірних відмінностей між групою з ЛПС-індукованим паркінсонізмом, що отримувала препарат диму, та групою з ЛПС-індукованим паркінсонізмом, що отримувала фізіологічний розчин, не спостерігалася.

У групи щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом спостерігалася достовірне ($p < 0,05$) зменшення маси товстої кишки у порівнянні із групою плацебо. Така тенденція не спостерігалася для інших груп, проте спостерігалася тенденція до зростання маси тимуса. Маса селезінки у всіх групах моделі паркінсонізму була приблизно однаковою.

Таким чином, хронічний вплив РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, сприяє розвитку запальних процесів у товстій кишці щурів, про що свідчить збільшення маси органу, прогресивне зменшення ваги та порушення процесів всмоктування води у цьому органі, як за модельованого паркінсонізму, так і при гострому коліті.

3.2. Вплив РМ диму на фізіологічні та біохімічні показники щурів з йодоацетамід-індукованим паркінсонізмом

3.2.1. Вплив РМ диму на зміни ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки

Дослідження ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів за хронічного впливу наночастинок диму природного походження має вагоме значення, оскільки порушення цілісності ендотеліального бар'єра може зумовлювати розвиток низки серцево-судинних та дихальних захворювань, сприяти розвитку локальних та системних запальних процесів [104]. Визначення ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів з виразковим колітом визначалася за оптичною густиною фарби Еванса в органі (рис. 3.2.1).

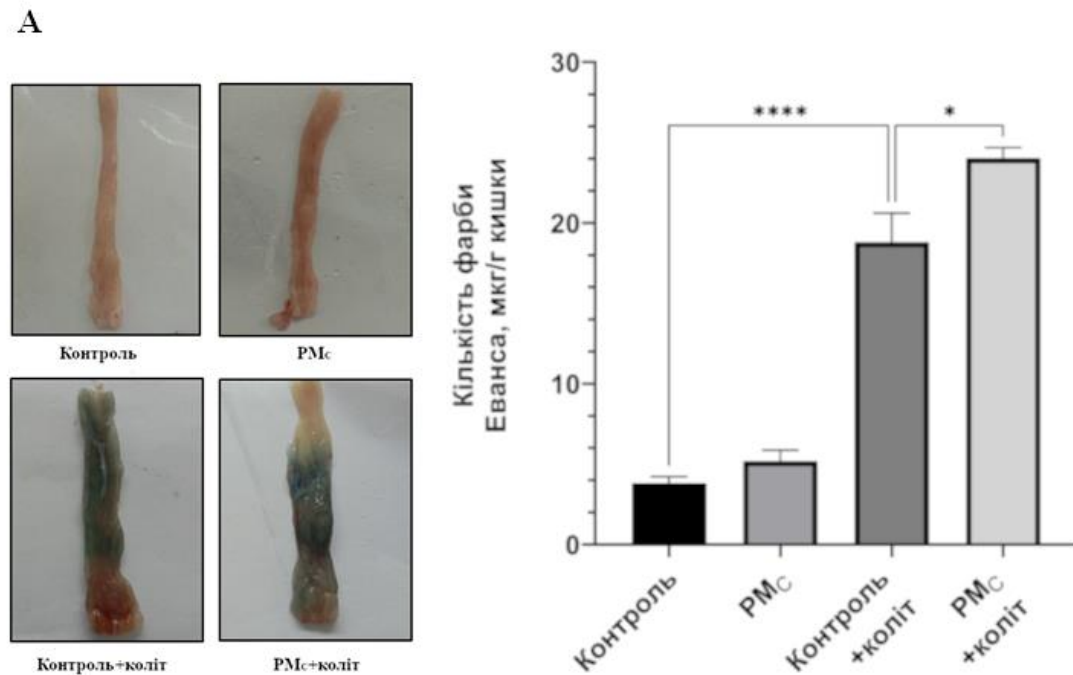


Рис. 3.2.1. Зміни ендотеліальної проникності слизової оболонки товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим виразковим колітом: репрезентативні знімки товстої кишки (А), кількісні показники проникності ендотелію (Б), $M \pm SEM$, $n=12$;

* - $p < 0,05$

**** - $p < 0,0001$

Хронічний вплив препарату РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі збільшував проникність ендотелію товстої кишки у щурів, про що свідчить наявність фарби Еванса у ділянці органу, де проводилося дослідження. Було відмічено достовірне зростання ($p < 0,0001$) проникності ендотелію у групі з модельованим колітом у порівнянні із контрольною групою, яке становило 15%. Також достовірне збільшення ($p < 0,05$) ендотеліальної проникності спостерігалось у групі тварин із виразковим колітом, що піддавалися хронічному впливу РМ_С, у порівнянні із групою контроль+коліт і становило 6%.

Таким чином, проникність ендотелію судин товстої кишки щурів збільшувалася за хронічного впливу наночастинок диму природного походження.

3.2.2. Вплив РМ диму на зміни рівня активності мієлопероксидази у товстій кишці щурів

Визначення активності МПО – лейкоцитарного ферменту-маркера запальних процесів, є важливим, оскільки підвищені рівні цього ферменту свідчать про розвиток гострого запалення в органі чи тканині та можуть використовуватися для оцінки тяжкості захворювання та/або прогнозування його перебігу [105]. Визначення активності мієлопероксидази товстої кишки щурів з виразковим колітом проводилося методом спектрофотометрії (рис. 3.2.2).

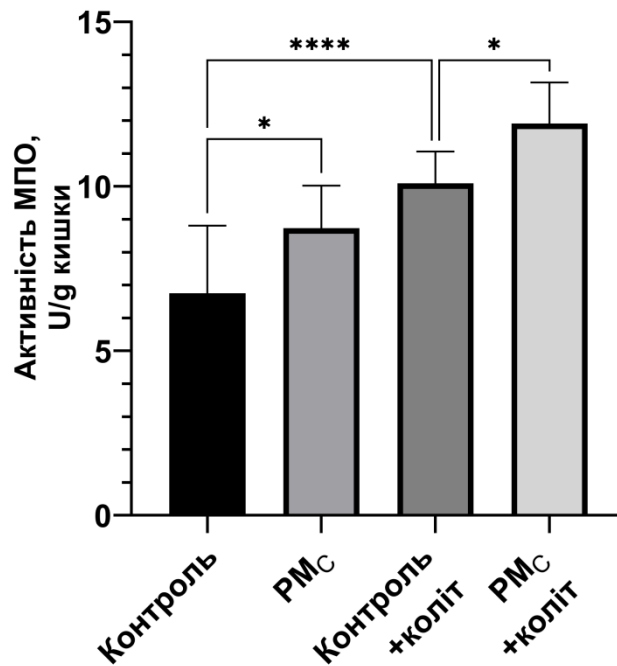


Рис. 3.2.2 Зміни активності мієлопероксидази у товстій кишці щурів з йодоацетамід-індукованим виразковим колітом за хронічного впливу РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, $M \pm SEM$, $n=40$;

* - $p < 0,05$

*** *- $p < 0,0001$

Хронічне введення препарату РМ_С мало негативний вплив на рівень активності МПО у товстій кишці щурів. Так, у тварин усіх груп спостерігалася стійка тенденція до зростання активності МПО. Достовірне ($p < 0,0001$) збільшення активності МПО спостерігалася між групами контроль та контроль+коліт. Також достовірне збільшення активності ферменту відмічалася у групи, тварини якої піддавалися хронічному впливу частинок диму, та групою, для тварин якої такий вплив був відсутнім ($p < 0,05$). Більш того, достовірне ($p < 0,05$) збільшення активності МПО спостерігалася у щурів з йодоацетамід-індукованим колітом, які зазнавали впливу РМ_С, та контрольною групою.

Таким чином, рівень активності МПО товстої кишки щурів збільшувався за хронічного впливу наночастинок диму природного походження, що свідчить про розвиток запальних процесів в органі.

3.2.3. Кількісні зміни поверхневого слизу товстої кишки щурів за хронічного впливу препарату РМ диму

Глікопротеїни, або муцини, являють собою головний високомолекулярний компонент слизу внутрішньої оболонки органів травної системи, в тому числі і товстої кишки. Більшу частину маси молекули глікопротеїнів складають глікани, які зумовлюють гель-формуючі властивості слизу та захищають стінки органів травної системи від розщеплення травними ферментами, запобігають всмоктування різних шкідливих та токсичних речовин тощо. Зміна кількості та концентрації гліканів слизу може призводити до розвитку різноманітних патологічних процесів, а також сприяти поширенню РМ диму до інших органів і їх систем та сприяти руйнуванню цілісності кишкового бар'єра [106]. Тому проводилося визначення гліканової частини глікопротеїнів слизу товстої кишки щурів із йодоацетамід-індукованим колітом за допомогою реакції Шифа на ПВДФ-мембрані (рис. 3.2.3).

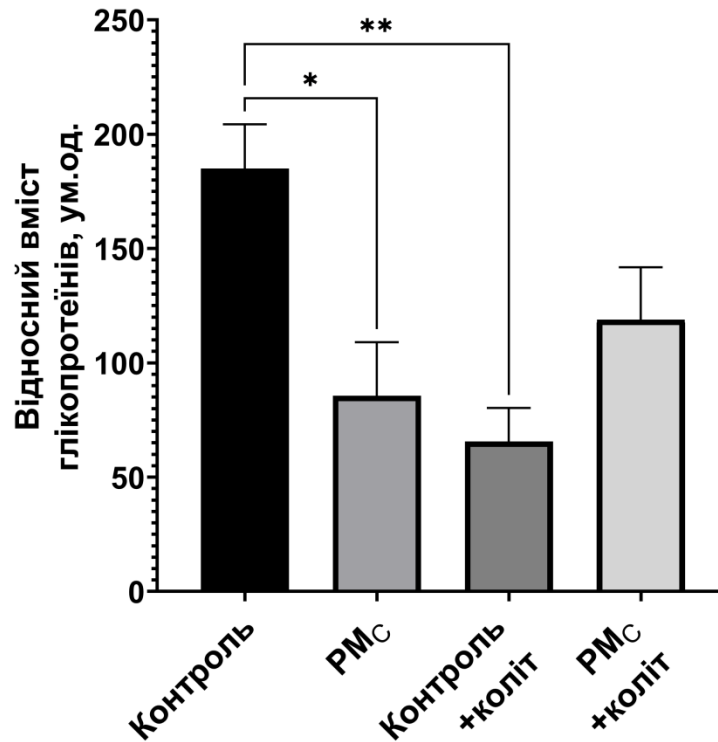


Рис. 3.2.3. Рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим виразковим колітом за хронічного впливу РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, $M \pm SEM$, $n=40$;

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

У результаті проведених досліджень було встановлено, що хронічний вплив препарату РМ_С значно впливав на відносний вміст глікопротеїнів слизу товстої кишки. У всіх груп спостерігалася тенденція до зниження вмісту гліканів слизу. Так, цей показник достовірно ($p < 0,05$) знижувався у щурів, що зазнавали хронічного впливу РМ_С, у порівнянні із контролем. Також, достовірне ($p < 0,01$) зниження кількості гліканів спостерігалось і між контрольними групами. Достовірних змін між групами РМ_С+коліт та РМ_С, а також контроль+коліт та РМ_С+коліт не спостерігалось, що може свідчити про те, що розвиток виразкового коліту також впливає на вміст гліканів у поверхневому слизі товстої кишки, зменшуючи при цьому роль РМ диму природного походження.

Таким чином, кількісні зміни поверхневого слизу товстої кишки за хронічного впливу РМ_С полягають у зменшенні гліканової частини глікопротеїнів муцину.

3.3. Оцінка ступеня нейродегенерації у щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом

Оцінку ступеня нейродегенерації у щурів проводили за допомогою апоморфін-індукованого ротаційного тесту. Дефіцит дофаміну зумовлює гіперчутливість ДА-рецепторів, тому введення апоморфіну, агоністу цих рецепторів, зумовлює у тварин виникнення циркуляторних рухів у контралатеральний бік щодо ураженої півкулі. Кількість таких рухів за певний проміжок часу залежить від ступеня дегенерації нейронів SNpc і зростає із прогресуванням хвороби [107]. Апоморфіновий тест проводили на тваринах з ЛПС-індукованим геміпаркінсонізмом (рис. 3.3).

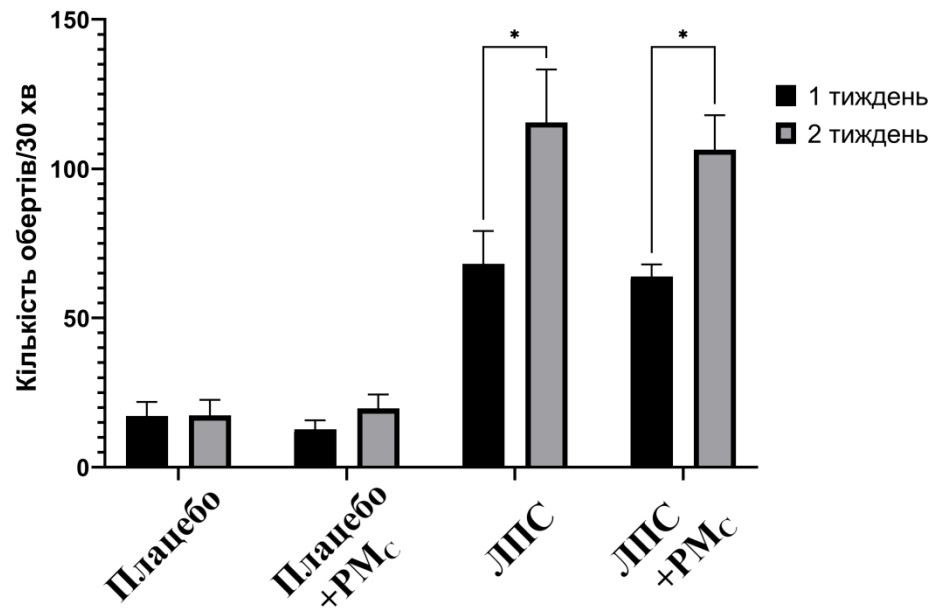


Рис. 3.3. Кількість апоморфін-індукованих обертів/30 хв, зроблених під час проходження 1-го та 2-го апоморфінового тесту, у щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом, $M \pm SEM$, $n=20$;

* - $p < 0,05$

На перший тиждень експерименту, середня кількість ротацій у щурів з ЛПС-геміпаркінсонізмом становила $68,17 \pm 11$ об/30хв, що становить менше 100 об/хв і відповідає 44% зруйнованих ДА нейронів. За другого апоморфінового тесту даний показник достовірно збільшувався до $115,5 \pm 3,06$ об/30хв, що становить близько 64% зруйнованих дофамінергічних нейронів. У щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом, які отримували препарат PM_c, кількість ротацій також достовірно збільшувалась ($p < 0,05$) і становила $65,50 \pm 5,4$ об/30хв та $109,67 \pm 15,27$ об/30хв на 1-й та 2-й тиждень відповідно. У групі плацебо достовірні зміни ротаційної поведінки не спостерігалися. У тварин групи плацебо+фізіологічний розчин та плацебо+PM_c спостерігалися поведінкові реакції грумінгу, прийомування тощо під час проведення тесту, що свідчить про відсутність дегенерації ДА нейронів SNpc. Достовірної різниці між групами плацебо+фізіологічний розчин та плацебо+PM_c, а також

між групами ЛПС+фізіологічний розчин та ЛПС+РМ_С як на перший, так і на другий тиждень не було виявлено.

Таким чином, проведена оцінка ступеня нейродегенерації у тварин з ЛПС-моделлю ХП підтвердила існуючі у науковій літературі дані щодо тенденції збільшення відсотку зруйнованих дофамінергічних нейронів з прогресуванням хвороби, але впливу РМ_С на зміну апоморфін-індукованої поведінки щурів не було виявлено.

3.4. Вплив препарату РМ_С на електрофізіологічні показники бар'єрної функції епітелію товстої кишки

Дослідження електрофізіологічних показників бар'єрної функції епітелію товстої кишки за хронічного впливу РМ_С має важливе значення, оскільки порушення цілісності та функціонування бар'єрної функції органу не лише зумовлює розвиток та прогресування різних хвороб та патологічних станів, а й перешкоджає всмоктуванню поживних речовин та води, лікарських засобів, сприяє потраплянню нейротоксинів та факторів запалення у системний кровообіг, порушує моторну та секреторну функції ШКТ, ускладнює перебіг захворювання та його лікування [108]. Оцінка електрофізіологічних показників бар'єрної функції епітелію товстої кишки проводилася за використання камери Уссінга за такими показниками як зміна струму короткого замикання, вплив карбахоліну на показник струму короткого замикання та зміна трансепітеліального опору.

3.4.1. Вплив препарату РМ_С на електрофізіологічні показники бар'єрної функції епітелію товстої кишки щурів з йодоацетамід-індукованим колітом

У всіх групах спостерігалось збільшення струму короткого замикання (рис. 3.4.1.1).

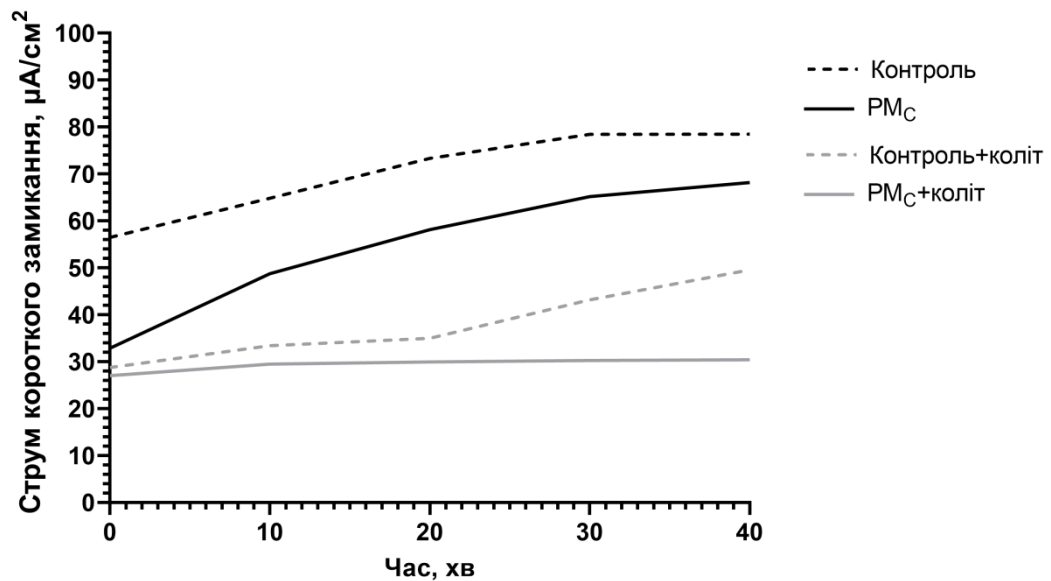


Рис. 3.4.1.1. Зміна струму короткого замикання мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів із модельованим йодоацетамід-індукованим виразковим колітом за хронічного впливу РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, n=12.

Для контрольної групи початкове значення струму короткого замикання становило $56 \pm 2,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Впродовж наступних 40 хвилин це значення зростало до $78 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. У тварин контрольної групи із модельованим колітом початкове значення було майже вдвічі меншим і за той самий проміжок часу зросло до $37 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Хронічне введення препарату РМ_С знижувало початкове значення струму короткого замикання, яке становило $33 \pm 9,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Проте, через 40 хвилин воно стрімко зростало

до рівня контрольних груп. У тварин групи РМ_С+коліт такий ефект не спостерігався, а відмічалось лише незначне, на $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, збільшення струму короткого замикання від початкового, яке залишалося на цьому рівні до кінця запису.

Додавання карбахоліну із серозної сторони зразка епітелію товстої кишки за умов норми зумовлює зростання струму короткого замикання (рис. 3.4.1.2), спричинене посиленою секрецією іонів Cl^- .

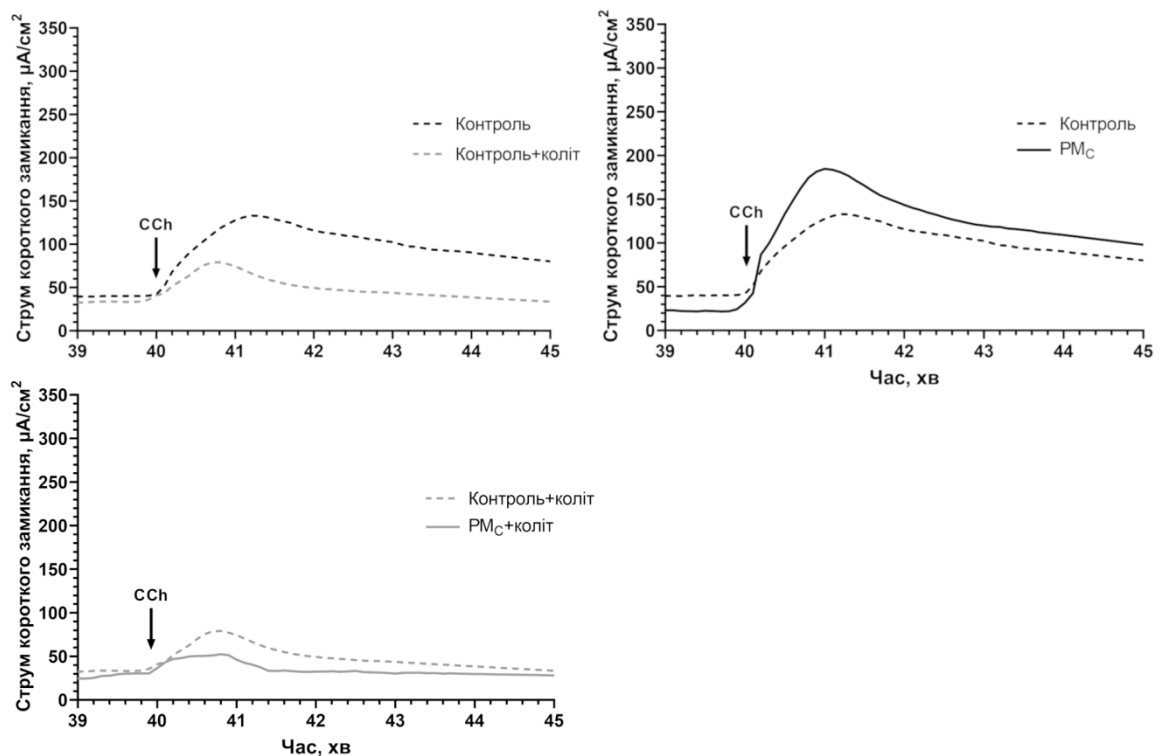


Рис. 3.4.1.2. Вплив карбахоліну (CCh) на показник струму короткого замикання мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів із модельованим йодоацетамід-індукованим виразковим колітом за хронічного впливу РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, $n=12$.

Для контрольної групи моделі коліту максимальне значення струму короткого замикання за дії карбахоліну становило $133 \pm 5,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. За йодоацетамід-викликаного коліту максимальне значення зростало до $79 \pm 1,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, а через 5 хвилин поверталось до вихідних значень. Для групи щурів, що піддавалася хронічному впливу РМ_С, підвищення цього показника

становило $185 \pm 7,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, при цьому через 5 хвилин знижувалося майже вдвічі. Наявність коліту та впливу РМ_С не зумовлювала різкого стрибка значень карбахолін-викликаного струму короткого замикання. Пік даного показника при цьому становив $52 \pm 0,6$, а повернення до вихідного значення відбувалося менше ніж за дві хвилини.

За моделі йодоацетамід-індукованого коліту значення трансепітеліального опору майже не змінилися впродовж 40 хвилин запису (рис. 3.4.1.3).

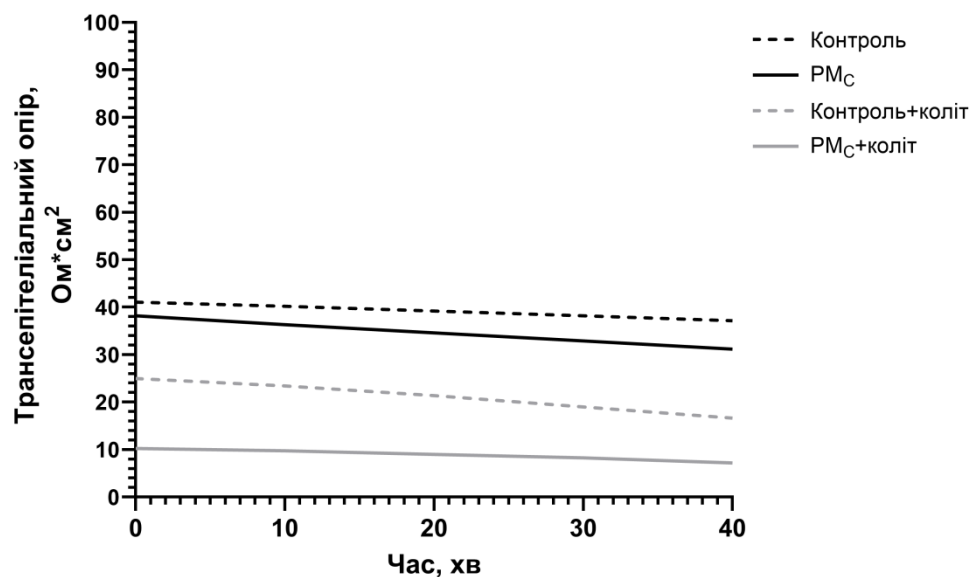


Рис. 3.4.1.3. Зміна трансепітеліального опору мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів із модельованим йодоацетамід-індукованим виразковим колітом, $n=12$.

Схожий ефект спостерігався і в групі тварин, що отримувала препарат РМ, достовірні зміни не спостерігалися. У групі щурів із модельованим колітом показник трансепітеліального опору був значно нижчим, у порівнянні із контролем. Так, для контрольної групи із колітом початкове значення опору становило $25 \pm 4,7 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ та знизилося вдвічі більше, ніж у контрольній групі. Для груп щурів із колітом, що піддавалася впливу РМ

димув, початковий та кінцевий показники були найнижчими серед усіх груп і становили $10 \pm 0,5 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ та $7,2 \pm 0,4 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ відповідно.

Таким чином, хронічний вплив препарату РМ_С диму природного походження, отриманих від згорання деревини тополі, мав негативний вплив на електрофізіологічні показники епітелію товстої кишки щурів з модельованим колітом, що свідчить про його здатність збільшувати негативні наслідки ЗЗК та нейродегенеративних захворювань.

3.4.2. Вплив препарату РМ_С на електрофізіологічні показники бар'єрної функції епітелію товстої кишки щурів з ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона

При моделі паркінсонізму хронічне введення препарату РМ_С знижувало стартові показники струму короткого замикання на відміну від контролю (рис. 3.4.2.1).

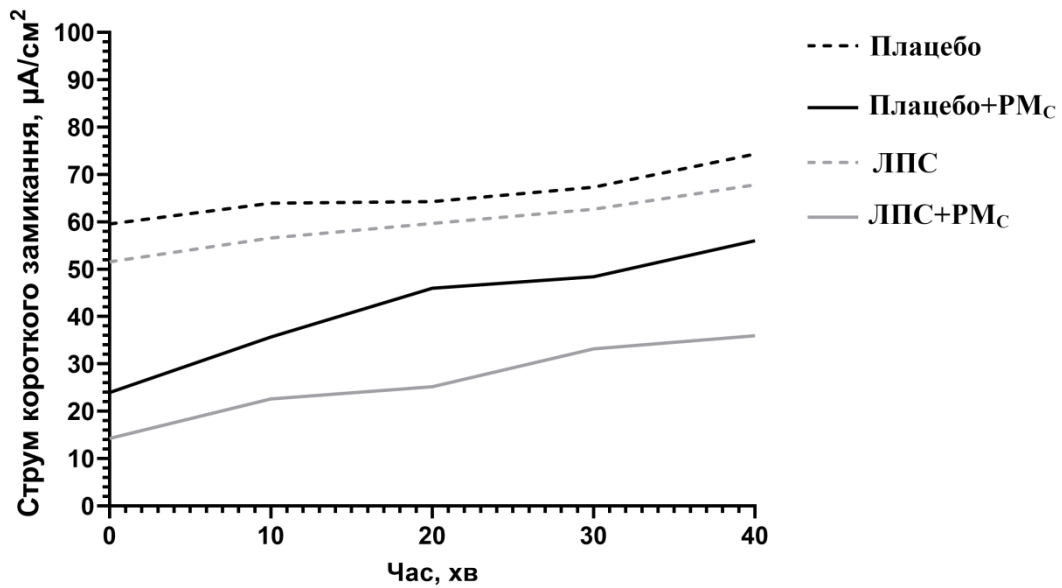


Рис. 3.4.2.1. Зміна струму короткого замикання мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом за хронічного впливу РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, n=20.

У групі щурів плацебо+фізіологічний розчин спостерігалися найвищі початкові та кінцеві значення даного показника, які становили $60 \pm 4,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ та $74 \pm 4,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ відповідно. За хронічного впливу РМ_c спостерігалось зниження початкових значень струму короткого замикання, проте вони стрімко зростали майже вдвічі через 40 хвилин запису. Даний показник для групи щурів з із ЛПС-індукованим паркінсонізмом, що піддавалися впливу РМ_c, був найнижчим. На відміну від групи плацебо, що отримувала препарат РМ_c, у групи з ЛПС-індукованим паркінсонізмом не спостерігалось різкого зростання показника. Стартове значення становило $14 \pm 1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, а кінцеве – лише $36 \pm 1,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Це свідчить про здатність препарату РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, значно поглиблювати негативні наслідки нейрозапалення.

Додавання карбахоліну з серозної сторони зразка епітелію товстої кишки зумовлювало різке підвищення значення струму короткого замикання

у всіх груп, при чому для групи ЛПС-індукованого паркінсонізму це зростання було більш стрімким, ніж для груп плацебо (рис. 3.4.2.2).

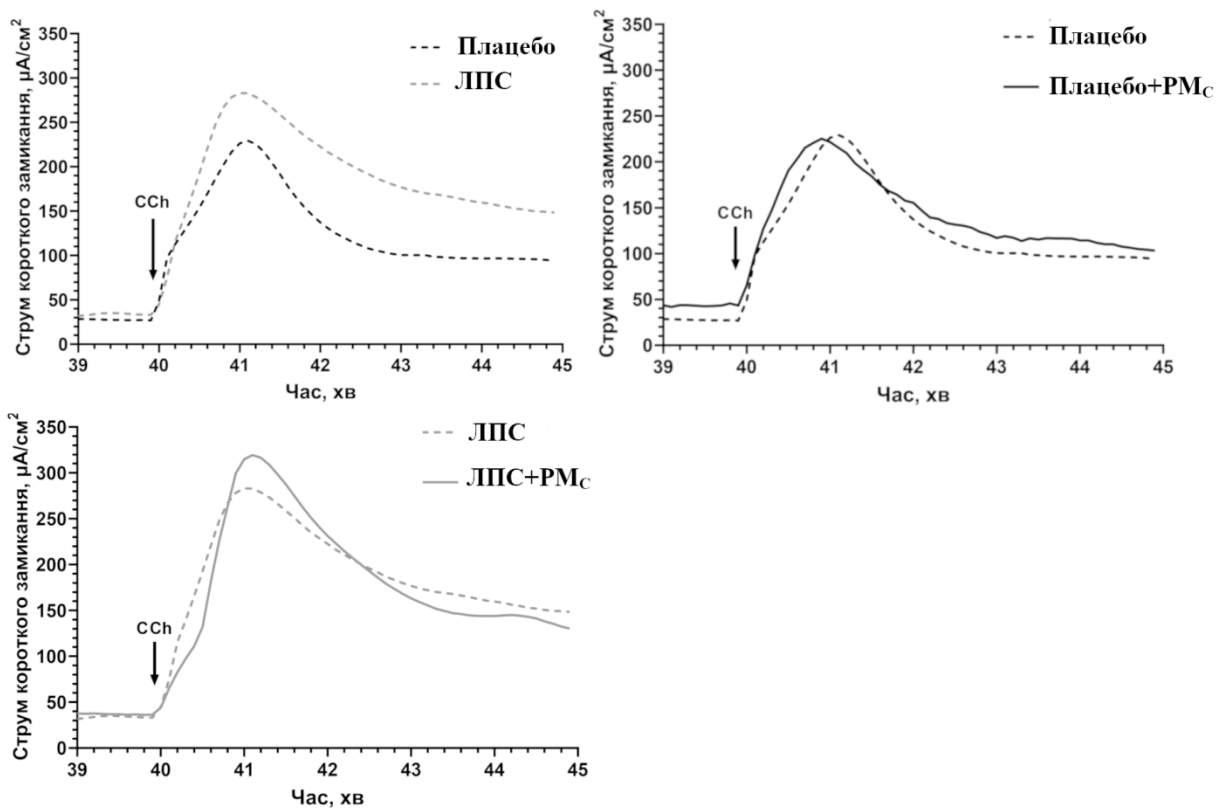


Рис. 3.4.2.2. Вплив карбахоліну (ССh) на показник струму короткого замикання мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів із ЛПС-індукованим паркінсонізмом за хронічного впливу РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, $n=20$.

Більш того, значення залишались високими навіть через 5 хвилин після додавання карбахоліну. Хронічне введення препарату РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, не мало суттєвого впливу на групи плацебо, проте мало посилюючий ефект у тварин з модельованим паркінсонізмом. Так, цей показник збільшувався на 15% у порівнянні із групою паркінсоніків, що отримувала фізіологічний розчин.

Схожі результати було зареєстровано і при дослідженні трансепітеліального опору епітелію товстої кишки щурів із ЛПС-індукованим паркінсонізмом (рис. 3.4.2.3).

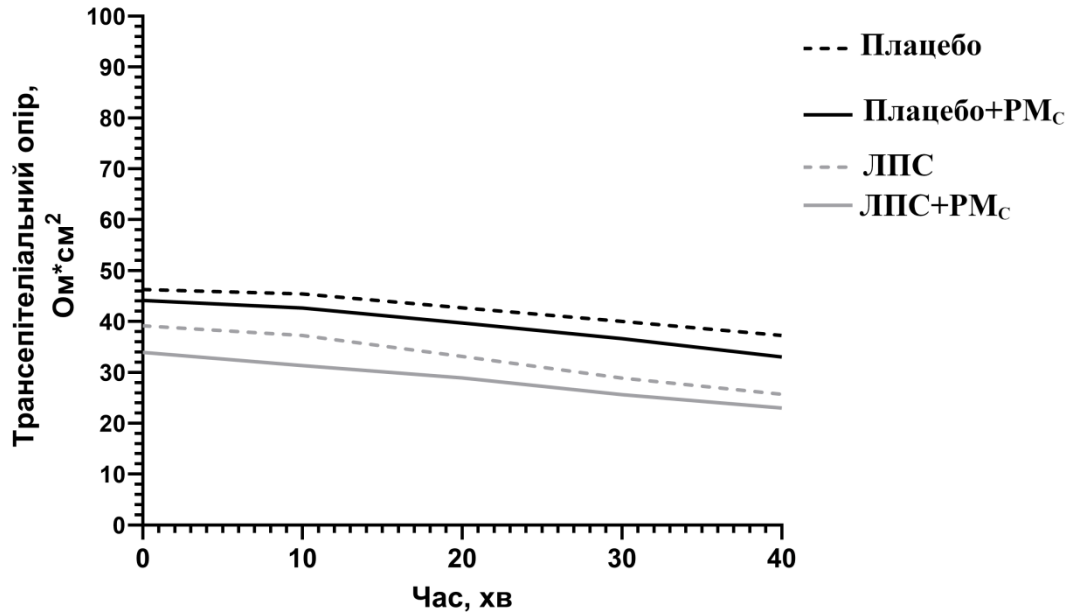


Рис. 3.4.2.3. Зміна трансепітеліального опору мукозо-серозних препаратів епітелію товстої кишки щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом, n=20.

Початкові значення даного показника були майже однаковими для усіх груп, проте спостерігалася тенденція до зниження значення опору. Найнижчим даний показник був у паркінсоніків, що піддавалися хронічному впливу РМ диму природного походження.

Таким чином, хронічний вплив препарату РМ_c мав негативний вплив на електрофізіологічні показники епітелію товстої кишки щурів з ЛПС-індукованим паркінсонізмом, що свідчить про його здатність збільшувати негативні наслідки ЗЗК та нейродегенеративних захворювань.

Хронічний вплив РМ диму, отриманих від згоряння деревини тополі, сприяє розвитку запальних процесів у товстій кишці щурів, що підтверджується збільшенням маси органу, а також підвищенням активності прозапального ферменту МПО. Більш того, РМ_С зумовлюють прогресивне зменшення ваги та порушення процесів всмоктування води у товстій кишці, як за модельованого паркінсонізму, так і при гострому коліті. Також було підтверджено існуючі у науковій літературі дані щодо збільшення проникності ендотелію судин за хронічного впливу наночастинок диму природного походження [109].

Було підтверджено збільшення відсотку зруйнованих дофамінергічних нейронів з прогресуванням ХП, але впливу РМ_С на зміну апоморфін-індукованої поведінки щурів не було виявлено [110].

Були виявлені і порушення функціонування бар'єрної функції товстої кишки за хронічного впливу РМ. Так, у щурів спостерігалось зменшення гліканової частини глікопротеїнів муцину слизового шару товстої кишки, а також збільшувалася ендотеліальна проникність органу. Наночастинки диму негативно впливали і на електрофізіологічні показники епітелію товстої кишки щурів. При цьому показники трансепітеліального опору та струму короткого замикання були найнижчими за хронічного впливу РМ_С.

Таким чином, результати дослідження показали, що РМ_С негативно впливають на основні функції товстої кишки, погіршують біохімічні та анатомо-фізіологічні показники щурів, а також зумовлюють посилення негативних наслідків ЗЗК та нейрозапалення.

ВИСНОВКИ

1. Було підтверджено, що тверді частинки, отримані від згоряння деревини тополі, мають негативний вплив на бар'єрну функцію товстої кишки. Під впливом твердих частинок диму відмічалось збільшення проникності органу, зниження трансепітеліального опору, а також значне посилення негативних наслідків модельованого коліту та нейрозапалення.

2. Наночастинки диму, отримані від згоряння деревини тополі, сприяють розвитку запальних процесів у шлунково-кишковому тракті та зумовлюють погіршення симптомів коліту та хвороби Паркінсона, що підтверджується втратою ваги тваринами при збільшенні маси товстої кишки та порушенні її всмоктувальної функції.

3. За хронічної експозиції твердих частинок, отриманих від згоряння деревини тополі, у щурів відмічали збільшення активності ферменту мієлопероксидази у товстій кишці, а також зниження гліканової частини глікопротеїнів слизу органу.

4. У щурів з йодоацетамід-модельованим колітом спостерігалось збільшення ендотеліальної проникності товстої кишки, яке додатково погіршувалось за хронічного впливу твердих частинок диму, отриманих від згоряння деревини тополі.

5. Апоморфіновий тест показав збільшення кількості обертальних рухів між першим та другим тижнем експерименту, що свідчить про збільшення зруйнованих дофамінергічних нейронів у щурів з модельованим паркінсонізмом, проте вплив твердих частинок, отриманих від згоряння деревини тополі, на поведінку щурів не був виявленим.

6. Було доведено, що тверді частинки, отримані від згоряння деревини тополі, негативно впливають на електрофізіологічні показники товстої кишки, про що свідчить суттєве зниження струму короткого замикання та трансепітеліального опору епітеліального шару органу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. (2020). GBD 2019 Risk Factors Collaborators. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 17:396(10258). pp. 1223-1249.
2. Thangavel, P., Park, D., Lee, Y.-C. (2022). Recent Insights into Particulate Matter (PM_{2.5})-Mediated Toxicity in Humans: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19. pp. 7506-7511.
3. Feng, J., Cavallero, S., Hsiai, T., Li, R. (2020). Impact of air pollution on intestinal redox lipidome and microbiome. *Free Radic Biol Med*, 1:151. pp. 99-110.
4. Parolisi, R., Montarolo, F., Pini, A., Rovelli, S., Cattaneo, A., Bertolotto, A. (2021). Exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) hampers myelin repair in a mouse model of white matter demyelination. *Neurochem Int*, 145:104991.
5. Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Derkinderen, P., Lebouvier, T. (2019). The gut in Parkinson's disease: Bottom-up, top-down, or neither? [online] Available at: <https://doi.org/10.1111/nmo.13777> [Accessed 19 Dec 2019].
6. Liu, Y., Pan, J., Zhang, H., Shi, C., Li, G., Peng, Z., Ma, J., Zhou, Y., Zhang, L. (2019). Short-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Asthma Mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 200. pp. 24–32.
7. Tiotiu, A.I., Novakova, P., Nedeva, D., Chong-Neto, H.J., Novakova, S., Steiropoulos, P., Kowal, K. (2020). Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17:6212.
8. World Health Organization. WHO Global Ambient Air Quality Database [online] Available at: <http://www.who.int/airpollution/data/cities/en/> [Accessed 13 June 2020].

9. Sompornrattanaphan, M., Thongngarm, T., Ratanawatkul, P., Wongsas, C., Swigris, J.J. (2020). The contribution of particulate matter to respiratory allergy. *Asian Pac. J. Allergy Immunol*, 38. pp. 19–28.
10. Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., Bezirtzoglou, E. (2020). Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Front. Public Health*, 8. pp. 14-23.
11. Bai, L., Wang, J., Ma, X., Lu, H. (2018). Air Pollution Forecasts: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15:780.
12. Lu, X., Li, R., Yan, X. (2021). Airway hyperresponsiveness development and the toxicity of PM_{2.5}. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28. pp. 6374–6391.
13. Newby D.-E. (2015). Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. pp. 83–93.
14. Masiol, M., Squizzato, S., Formenton, G., Khan, M.-B., Hopke, P.-K., Nenes, A. (2020). Hybrid multiple-site mass closure and source apportionment of PM₂₅ and aerosol acidity at major cities in the Po Valley. *Sci Total Environ*, 704:135287.
15. Pryor, J.T., Cowley, L.O., Simonds, S.E. (2022). The Physiological Effects of Air Pollution: Particulate Matter, Physiology and Disease. *Front Public Health*, 14;10:882569.
16. Park, M., Joo, H.S., Lee, K., Jang, M., Kim, S.D., Kim, I. (2018). Differential toxicities of fine particulate matters from various sources. *Sci Rep*. 8:17007.
17. Harrison, R.M. (2020). Airborne particulate matter. *Phil. Trans. R. Soc*, 3782019031920190319.
18. Misra, C., Geller, M.D., Shah, P., Sioutas, C., Paul, A., Solomon P. A. (2014). Development and Evaluation of a Continuous Coarse (PM 10 – PM 25) Particle Monitor Development and Evaluation of a Continuous Coarse. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, pp. 37–41.

19. Atkinson, R.W., Fuller, G.W., Anderson, H.R., Harrison, R.M., Armstrong, B. (2010). Urban Ambient Particle Metrics and Health. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21. pp. 312-316.
20. Li, D., Li, Y., Li, G., Zhang, Y., Li, J., Chen, H. (2019). Fluorescent reconstitution on deposition of PM₂₅ in lung and extrapulmonary organs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116. pp. 2488–2493.
21. Almeida, S., Manousakas, M., Diapouli, E., Kertesz, Z., Samek, L., Hristova, E., Šega, K., Alvarez, R.P., Belis, C., Eleftheriadis, K. (2020). Ambient particulate matter source apportionment using receptor modelling in European and Central Asia urban areas. *Environ. Pollut*, 266. 115-199.
22. Brook, R.D. (2010). Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease An Update to the Scientific Statement From the American. . *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 44. pp. 502-510.
23. Jackson, S., Mathews, K.H., Pulanić, D., Falconer, R., Rudan, I., Campbell, H., Nair, H. (2013). Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children—A systematic review and meta-analysis. *Croat. Med. J.*, 54, pp. 110–121.
24. World Health Organization. (2021). Global Health Observatory: Ambient Air Pollution. [online] Available at: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/indicator-groups/indicator-group-details/GHO/ambient-air-pollution> [Accessed 30 Jan 2022].
25. Garcia, G.J., Schroeter, J.D., Kimbell, J.S. (2015). Olfactory deposition of inhaled nanoparticles in humans. *Inhal Toxicol*, 27. pp. 394–403.
26. Mutlu, E.A., Comba, I.Y., Cho, T., Engen, P.A., Yazici, C., Soberanes, S. (2018). Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome. *Environ Pollut*, 240. pp. 817–830.

27. Whitsett, J.A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann Am Thorac Soc*, 15. pp. 143-148.
28. Whitsett, J.A., Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*, 16. pp. 27–35.
29. Miller, M.R., Raftis, J.B., Langrish, J.P., McLean, S.G., Samutrtai, P., Connell, S.P. (2017). Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease. *ACS Nano*, 11. pp. 4542–4552.
30. Xian M, Ma S, Wang K, Lou H, Wang Y, Zhang L, et al.. Particulate matter 25 causes deficiency in barrier integrity in human nasal epithelial cells. *Allergy Asthma Immunol Res.* (2020) 12:56–71. 10.4168/aair.2020.12.1.56
31. Bove, H., Bongaerts, E., Slenders, E., Bijmens, E.M., Saenen, N.D., Gyselaers, W. (2019). Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta. *Nat Commun*, 10. pp. 38-66.
32. Xie, W., You, J., Zhi, C., Li, L. (2021). The toxicity of ambient fine particulate matter (PM₂₅) to vascular endothelial cells. *J Appl Toxicol.*, 41. pp. 713–723.
33. Wang, Y., Tang, M. (2019). PM_{2.5} induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance. *Environ Pollut.*, 254. pp. 112-134.
34. Wang, J., Zhang, W.J., Xiong, W., Lu, W.H., Zheng, H.Y., Zhou, X. (2019). PM₂₅ stimulated the release of cytokines from BEAS-2B cells through activation of IKK/NF-kappaB pathway. *Hum Exp Toxicol.*, 38. pp. 311–320.
35. Fu, H., Liu, X., Li, W., Zu, Y., Zhou, F., Shou, Q. (2020). PM₂₅ exposure induces inflammatory response in macrophages via the TLR4/COX-2/NF-kappaB pathway. *Inflammation*, 43. pp. 1948–1958.
36. Analitis, A., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Samoli, E., Nikoloulopoulos, A.K., Petasakis, Y. (2006). Short-term effects of

- ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. *Epidemiology*, 17. pp. 230–233.
37. Zanobetti, A., Franklin, M., Koutrakis, P., Schwartz, J. (2009). Fine particulate air pollution and its components in association with cause-specific emergency admissions. *Environ Health.*, 8. pp. 44-58.
38. Winterbottom, C.J., Shah, R.J., Patterson, K.C., Kreider, M.E., Panettieri, R.A. Jr, Rivera-Lebron, B. (2018). Exposure to ambient particulate matter is associated with accelerated functional decline in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.*, 153. pp. 1221–1228.
39. Aryal, A., Harmon, A.C., Dugas, T.R. (2021). Particulate matter air pollutants and cardiovascular disease: strategies for intervention. *Pharmacol Ther*, 223. pp. 107-127.
40. Zhang, M., Mueller, N.T., Wang, H., Hong, X., Appel, L.J. (2018). Wang X. Maternal exposure to ambient particulate matter ≤ 25 μm during pregnancy and the risk for high blood pressure in childhood. *Hypertension.*, 72. pp. 194–201.
41. Liang, R., Zhang, B., Zhao, X., Ruan, Y., Lian, H., Fan, Z. (2014). Effect of exposure to PM_{2.5} on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*, 32. pp. 2130–2140.
42. Krishnan, R.M., Adar, S.D., Szpiro, A.A., Jorgensen, N.W., Van Hee V.C., Barr, R.G. (2012). Vascular responses to long- and short-term exposure to fine particulate matter: MESA Air (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution). *J Am Coll Cardiol.*, 60. pp. 2158–2166.
43. Pambianchi, E., Pecorelli, A., Valacchi, G. (2022). Gastrointestinal tissue as a “new” target of pollution exposure. *IUBMB Life*, 74. pp. 62–73.
44. Bas, P.M., Verhaegh, Esmee M., Bijmans, Tim, R.A., van den Heuvel, Danny Goudkade, Maurice, P., Zeegers, Tim S., Nawrot, Ad A.M., Masclee, Daisy M.A.E., Jonkers, Marieke, J., Pierik. (2019). Ambient air

- quality as risk factor for microscopic colitis – A geographic information system (GIS) study, *Environmental Research*, 178. pp. 212-215.
45. Pambianchi, E., Pecorelli, A., Valacchi, G. (2022). Gastrointestinal tissue as a “new” target of pollution exposure. *IUBMB Life*. pp. 74:62.
46. Chen, C.H., Huang, L.Y., Lee, K.Y., Wu, C.D., Chiang, H.C., Chen, B.Y. (2019). Effects of PM₂₅ on skeletal muscle mass and body fat mass of the elderly in Taipei, Taiwan. *Sci Rep.*, 9. pp. 170-176.
47. Parolisi, R., Montarolo, F., Pini, A., Rovelli, S., Cattaneo, A., Bertolotto, A. (2021). Exposure to fine particulate matter (PM₂₅) hampers myelin repair in a mouse model of white matter demyelination. *Neurochem Int*. pp. 442-445.
48. Rhew, S.H., Kravchenko, J., Lysterly, H.K. (2021). Exposure to low-dose ambient fine particulate matter PM₂₅ and Alzheimer's disease, non-Alzheimer's dementia, and Parkinson's disease in North Carolina. *PLoS ONE*, 32. pp. 24-34.
49. Younan, D., Petkus, A.J., Widaman, K.F., Wang, X., Casanova, R., Espeland, M.A. (2020). Particulate matter and episodic memory decline mediated by early neuroanatomic biomarkers of Alzheimer's disease. *Brain.*, 143. pp. 289–302.
50. Nunez, Y., Boehme, A.K., Li, M., Goldsmith, J., Weisskopf, M.G., Re, D.B. (2021). Parkinson's disease aggravation in association with fine particle components in New York State. *Environ Res.*, 201. pp. 554-579.
51. Liu, F., Huang, Y., Zhang, F., Chen, Q., Wu, B., Rui, W. (2015). Macrophages treated with particulate matter PM₂₅ induce selective neurotoxicity through glutaminase-mediated glutamate generation. *J Neurochem.*, 134. pp. 315–326.
52. Gonzalez-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Torres-Jardon, R., Mukherjee, P.S., Calderon-Garciduenas, L. (2017). Combustion-derived nanoparticles in key brain target cells and organelles in young urbanites:

- culprit hidden in plain sight in Alzheimer's disease development. *J Alzheimers Dis.*, 59. pp. 189–208.
53. Fumery, M., Singh, S., Dulai, P.S., Gower-rousseau, C. (2017). Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, pp. 44-48.
54. Pasvol, T.J., Horsfall, L., Bloom, S. (2020). Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in UK primary care: a population-based cohort study. *BMJ Open*. pp. 365-384.
55. Bernstein, C.N. (2018). A Review of Mortality and Surgery in Ulcerative Colitis : Milestones of the Seriousness of the Disease. *J Appl Toxicol.*, 1. pp. 253–267.
56. Yadav, S., Dave, M., Edakkanambeth Varayil, J., Harmsen, W.S., Tremaine, W.J., Zinsmeister, A.R., Sweetser, S.R., Melton, L.J., Sandborn, W.J., Loftus, E.V. (2015). A population-based study of incidence, risk factors, clinical spectrum, and outcomes of ischemic colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 13(4). pp. 731-738.
57. Pardi, D.S. (2017). Diagnosis and Management of Microscopic Colitis. *Am J Gastroenterol.*, 112(1). pp. 78-85.
58. Colman, R. J., Rubin, D.T. (2016). Histological inflammation increases the risk of colorectal neoplasia in ulcerative colitis : a systematic review. *Epidemiology*, 14(3). pp. 202–210.
59. Leddin, D. (2021). Uniting the Global Gastroenterology Community to Meet the Challenge of Climate Change and Nonrecyclable Waste. *J. Clin. Gastroenterol.*, 55. pp. 823–829.
60. Herrinton, L.J., Liu, L., Levin, T.R., Allison, J.E., Lewis, J.D., Velayos, F. (2012). Incidence and Mortality of Colorectal Adenocarcinoma in Persons With Inflammatory Bowel Disease From 1998 to 2010. *YGAST*, 143 (2). pp. 382–389.

61. Ascherio, A., Schwarzschild, M.-A. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology*, 15(12). pp. 14-23.
62. Xi, Y., Feng, D., Tao, K., Wang, R., Shi, Y., Qin, H., Zhao, G. (2018). MitoQ protects dopaminergic neurons in a 6-OHDA induced PD model by enhancing Mfn2-dependent mitochondrial fusion via activation of PGC-1 α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(9). pp. 17-33.
63. Kouli, A., Kelli, M.-T., Wei-Li, K. (2018). Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. *Codon Publications*. pp. 810-821.
64. Pickrell, A.-M., Youle, R.-J. (2015). The roles of PINK1, Parkin and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85(2). pp. 257–273.
65. Schulte, C., Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: Inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet*, 4. pp. 67–80.
66. Polymeropoulos, M.-H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.-E., Dehejia, A., Dutra, A. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321). pp. 344-358.
67. Healy, D.-G., Falchi, M., O'Sullivan, S.-S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S. (2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: A case-control study. *Lancet Neurol*, 7(7). pp. 583–591.
68. Denga, I., Corriganb, Z., Zhaic, G., Zhoua, X.-F., Bobrovskaya, L. (2020). Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. *Brain, Behavior, & Immunity*, 4. pp. 231-139.
69. Olgati, S., Quadri, M., Fang, M., Rood, J., Saute, J.-A., Chien, H.-F. (2016). DNAJC6 mutations associated with early-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 79(2). pp. 244–256.

70. Nalls, M.-A., Pankratz, N., Lill, C.-M., Do, C.-B., Hernandez, D.-G., Saad, M. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 46(9). pp. 989–993.
71. Tysnes, O.-B., Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 124(8). pp. 5-9.
72. Nutt, J.-G., Curtze, C., Hiller, A., Anderson, S., Larson, P.-S., Van Laar, A.-D., Richardson, R.-M., Thompson, M.-E, Sedkov, A., Leinonen, M., Ravina, B., Bankiewicz, K.-S., Christine C.-W. (2020). Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Therapy Enhances Levodopa Response in Parkinson's Disease. [online] Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mds.27993> [Accessed 12 Jan. 2020].
73. Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139 (1). pp. 318–324.
74. de Moraes Filho, A.-V., Chaves, S.-N., Martins, W.R., Golentino, G.-P., de Cássia Pereira Pinto Homem, R., de Farias, G.-L., Fischer, B.-L., Azevedo Oliveira, J., Kênia Abreu Pereira, S., Vidal, S.-E., Mota, M.R., Lima, R.M., de Oliveira, R.-J. (2020). Progressive Resistance Training Improves Bradykinesia, Motor Symptoms and Functional Performance in Patients with Parkinson's Disease. [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986410/> [Accessed 23 Jan. 2020].
75. Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2). pp. 223–236.
76. Pfeiffer, R.-F. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. pp. 3-7.
77. Baig, F., Lawton, M., Rolinski, M., Ruffmann, C., Nithi, K., Evetts, S.-G. (2015). Delineating nonmotor symptoms in early Parkinson's disease and first-degree relatives. *Movement Disorders*. pp. 1-3.

78. Zucca, F.-A., Segura-Aguilar, J., Ferrari, E., Muñoz, P., Paris, I., Sulzer, D., Zecca, L. (2017). Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 155. pp. 96–119.
79. Houser, M.-C., Tansey, M.-G. (2017). The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649603> [Accessed 11 Jan. 2017].
80. Klingelhoefer, L., Reichmann, H. (2015). Pathogenesis of Parkinson disease, the gut–brain axis and environmental factors. *Nat. Rev. Neurol.* pp. 167-174.
81. [Seguella, L., Sarnelli, G., Esposito, G. \(2019\)](#) Leaky gut, dysbiosis, and enteric glia activation: the trilogy behind the intestinal origin of Parkinson's disease. [online] Available at: <http://www.nrronline.org/article.asp?issn=1673-5374;year=2020;volume=15;issue=6;spage=1037;epage=1038;aulast=Seguella> [Accessed 10 Dec. 2019].
82. Zadikoff, C., Poewe, W., Boyd, J.-T., Bergmann, L., Ijacu, H., Kukreja, P., Robieson, W.-Z., Benesh, J., Antonini, A. (2020). Safety of Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel Treatment in Patients with Advanced Parkinson's Disease Receiving ≥ 2000 mg Daily Dose of Levodopa. [online] Available at: <https://doi.org/10.1155/2020/9716317> [Accessed 13 Feb 2020].
83. Ren, T., Gao, Y., Qiu, Y., Jiang, S., Zhang, Q., Zhang, J., Wang, L., Zhang, Y., Wang, L., Nie, R. (2020). Gut Microbiota Altered in Mild Cognitive Impairment Compared With Normal Cognition in Sporadic Parkinson's Disease. [online] Available at: <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00137> [Accessed 25 Feb. 2020].
84. Kulshreshtha, D., Ganguly, J., Jog, M. (2020). Managing autonomic dysfunction in Parkinson's disease: a review of emerging drugs. [online]

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32067502> [Accessed 20 Feb. 2020].

85. Faivre, F., Joshi, A., Bezard, E., Barrot, M. (2018). The hidden side of Parkinson's disease: studying pain, anxiety and depression in animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. pp. 13-18.
86. Duty, S., Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol*, 164. pp. 1357-1391.
87. Stoker, T.B., Greenland, J.-C. (2018). Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. *Codon Publications*. pp. 218-225.
88. Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L.-M., Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología*, 32(8). pp. 533-539.
89. Chandrasekhar, Y., Phani Kumar, G., Ramya, E.-M., Anilakumar, K.-R. (2018). Gallic Acid Protects 6-OHDA Induced Neurotoxicity by Attenuating Oxidative Stress in Human Dopaminergic Cell Line. *Neurochemical Research*, 43(6). pp. 8-13.
90. He, Q., Yu, W., Wu, J., Chen, C., Lou, Z., Zhang, Q., Zhao, J., Wang, J., Xio, B. (2013). Intranasal LPS-mediated Parkinson's model challenges the pathogenesis of nasal cavity and environmental toxins. *PloS One*, 8. pp. 1023-1027.
91. Khan, M.-S., Ali, T., Kim, M.-W., Jo, M.-H., Chung, J.-I., Kim, M.-O. (2018). Anthocyanins improve hippocampus-dependent memory function and prevent neurodegeneration via JNK/Akt/GSK3 β signaling in LPS-treated adult mice. *Mol. Neurobiol*. pp. 367-372.
92. Wang, J., He, C., Wu, W.-Y., Chen, F., Wu, Y.-Y., Li, W.-Z., Chen, H.-Q., Yin, Y.-Y. (2015). Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage and oxidative stress in a rat

- model of Parkinson's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 138. pp. 96-103.
93. Kuter, K., Olech, Ł., Głowacka, U. (2018). Prolonged dysfunction of astrocytes and activation of microglia accelerate degeneration of dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and block compensation of early motor dysfunction induced by 6-OHDA. *Mol. Neurobiol.*, 55. pp. 3049-3066.
94. Bao, L.-H., Zhang, Y.-N., Zhang, J.-N., Gu, L., Yang, H.-M., Huang, Y.-Y., Xia, N., Zhang, H. (2018). Urate inhibits microglia activation to protect neurons in an LPS-induced model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation*, 15. pp. 131-139.
95. Zheng, H.-F., Yang, Y.-P., Hu, L.-F., Wang, M.-X., Wang, F., Cao, L.-D. Li, D., Mao, C.-J., Xiong, K.-P., Wang, J.-D., Liu, C.-F. (2013). Autophagic impairment contributes to systemic inflammation-induced dopaminergic neuron loss in the midbrain. *PloS One*, 8. pp. 97-104.
96. Kelly, L.-P., Carvey, P.-M., Keshavarzian, A., Shannon, K.-M., Shaikh, M., Bakay, R.-A.-E., Kordower, J.-H. (2014). Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Mov. Disord. Soc.*, 29. pp. 999-1009.
97. Satoh, H., Sato, F., Takami, K., Szabo, S. (2018). New Ulcerative and Colitis Model Induced by Sulfhydryl Drugs Blockers on the Colitis in Rats the Effects of Antiinflammatory. *Codon Publications*. pp. 118-133.
98. Larauche, M. (2009). Cortagine, a CRF 1 agonist , induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Journal of Neural Transmission*, 14(3). pp. 65-79.
99. Akiba, Y. (2018). Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *Environ Health.*, 7(2). pp. 437-447.

100. Hoban, D.B., Connaughton, E., Connaughton, C. (2013). Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: A comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. *Brain. Behav. Immun.*, 27. pp. 91–100.
101. Таланов, С. (2014). Спосіб удосконалення моделі геміпаркінсонізму у щурів. [online] Available at: <http://uapatents.com/7-87583-sposib-udoskonalennya-modelyuvannya-gemiparkinsonizmu-u-shhuriv.html> [Accessed 10 Feb. 2014].
102. Brown, D.R., Grady, S.M.O. (2008). The Ussing Chamber and Measurement of Drug Actions on Mucosal Ion Transport. [online] Available at: doi: 10.1002/0471141755.ph0712s41 [Accessed 23 May 2008].
103. Barichella, M., Cereda, E., Cassani, E., Pinelli, G., Iorio, L., Ferri, V., Privitera, G., Pasqua, M., Valentino, A., Monajemi, F., Caronni, S., Lignola, C., Pusani, C., Bolliri, C., Faierman, S.-A., Lubisco, A., Frazzitta, G., Petroni, M.-L., Pezzoli, G. (2016). Dietary habits and neurological features of Parkinson's disease patients: Implications for practice. *Clinical nutrition*. pp. 111-114.
104. Liu, J., Ye, X., Ji, D., Zhou, X., Qiu, C., Liu, W., Yu, L. (2018). Diesel exhaust inhalation exposure induces pulmonary arterial hypertension in mice. *Environ Pollut*, 237. pp. 747–755.
105. Karakas, M. (2012). Myeloperoxidase is associated with incident coronary heart disease independently of traditional risk factors: Results from the MONICA/KORA Augsburg study. *J Intern Med*, 271. pp. 43-50.
106. McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H. (2011). Focus on mucosal mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Publ. Gr.*, 9(4). pp. 265–278.

107. Borkar, N., Mu, H., Holm, R. (2017). Challenges and trends in apomorphine drug delivery systems for the treatment of parkinson's disease. *Asian J Pharmaceutical Sci.* pp. 9-11.
108. Beamish, L. A., Osornio-Vargas, A. R., Wine, E. (2011). Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *Journal of Crohn's & colitis*, 5(4), 279–286.
109. Dai, J., Chen, W., Lin, Y., Wang, S., Guo, X., Zhang, Q.Q. (2022). Exposure to Concentrated Ambient Fine Particulate Matter Induces Vascular Endothelial Dysfunction via miR-21. *Int J Biol Sci*, 18(4). pp. 148-155.
110. Carbone, F., Djamshidian, A., Seppi, K., Poewe, W. (2019). Apomorphine for Parkinson's Disease: Efficacy and Safety of Current and New Formulations. *CNS Drugs*, 33(9). pp. 905-918.