

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
Нипорко Олексій Юрійович
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 20__ р.

**ВИЗНАЧЕННЯ НЕГАТИВНИХ НАСЛІДКІВ ВПЛИВУ
НАНОЧИСТИНОК ДИМУ ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ
НА СТАН КИШКОВОГО БАР'ЄРУ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки напряму підготовки
162 Біотехнології та біоінженерія
ОП Високі технології (Біотехнологія)

Ручко Валерії Вікторівни

(підпис)

Науковий керівник: д.б.н., проф.

Толстанова Ганна Миколаївна

(підпис)

Оцінка захисту роботи

Київ, 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Відповідно до літературних даних забруднення повітря твердими наночастинками є причиною багатьох негативних наслідків для здоров'я людини, впливаючи на важливі системи людського організму: дихальну, серцеву, центральну нервову та шлунково-кишковий тракт. Метою цієї роботи було дослідити негативний вплив наночастинок димів, отриманих з природних попередників, на стан кишкового бар'єру та їх зв'язок із розвитком запальних захворювань кишечника. Для цього досліджувались електрофізіологічні характеристики і парацелюлярна проникність кишечника за допомогою установки камери Уссінга, а також прозапальні зміни за допомогою реакції Шифа, визначення активності мієлопероксидази та транслокації бактерій у кров при моделюванні гострого йодоацетамід-викликаного коліту.

Ключові слова: наночастинки диму, кишковий бар'єр, експериментальний коліт, запальні захворювання кишечника.

According to the literature, air pollution with solid nanoparticles is the cause of many negative consequences for human health, affecting essential systems of the human body: respiratory, cardiac, central nervous, and gastrointestinal tract. This study aimed to investigate the harmful effects of smoke nanoparticles derived from natural precursors on the state of the intestinal barrier and their relationship with the development of inflammatory bowel disease. To do this, the intestine's electrophysiological characteristics and paracellular permeability were studied using the Ussing chamber, and proinflammatory changes were studied using the Schiff reaction, determination of myeloperoxidase activity, and translocation of bacteria into the blood in the simulation of acute iodoacetamide-induced colitis.

Key words: smoke nanoparticles, intestinal barrier, experimental colitis, inflammatory bowel disease.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Характеристика твердих частинок як компонентів забрудненого атмосферного повітря.....	7
1.1.1. Класифікація твердих частинок.....	8
1.1.2. Хвороби, спричинені забрудненням повітря твердими частинками.....	10
1.2 Загальна характеристика запальних захворювань кишечника	12
1.3 Роль твердих частинок забрудненого повітря у розвитку запальних захворювань кишечника.....	15
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	18
2.1 Визначення найбільш токсичного препарату диму природнього походження.....	18
2.1.1 Лабораторні тварини та досліджувані речовини	18
2.1.2 Реєстрація електрофізіологічних характеристик у камері Уссінга	
Помилка! Закладку не визначено.	
2.1.3 Визначення парацелюлярної проникності серо-мукозального препарату товстої кишки щурів.....	22
2.2. Дослідження впливу наночастинок диму природнього походження при експериментальному гострому коліті	24
2.2.1. Схема проведення дослідження	24
2.2.2. Визначення проникності ендотелію товстої кишки щурів.....	25
2.2.3. Моделювання експериментального коліту у щурів	25
2.2.4. Визначення глікопротеїнів слизу методом реакції Шифа на PVDF-мембрані	26
2.2.5. Визначення транслокації бактерій в кров	27
2.2.6. Визначення активності мієлопероксидази у слизовій оболонці товстої кишки	27

2.2.7. Статистична обробка результатів.....	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	29
3.1. Визначення токсичних властивостей препаратів наночастинок диму, отриманих з природніх попередників.....	29
3.1.1. Дослідження впливу препаратів наночастинок диму на електрофізіологічні характеристики епітелію товстої кишки.....	29
3.1.2 Дослідження впливу препаратів з РМ на парацелюлярну проникність кишкового бар'єру	37
3.2. Вплив препарату з наночастинками-забруднювачами повітря природнього походження на бар'єрну функцію товстої кишки в залежності від шляху його введення	42
3.2.1. Вплив препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі (С1) на проникність ендотелію товстої кишки	42
3.2.2. Зміна кількості поверхневого слизу товстої кишки щурів після введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі	45
3.2.3. Визначення транслокації бактерій в кров	46
3.2.4. Визначення активності мієлопероксидази у товстій кишці щурів у залежності від способу введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі.....	47
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ВК – виразковий коліт
- ЗЗК – запальні захворювання кишечника
- КУО – колонієутворююча одиниця
- МПО – мієлопероксидаза
- ХК – хвороба Крона
- В1 – препарат, отриманий від спалювання деревини берези
- В2 – препарат, отриманий від спалювання кори берези
- С1 – препарат, отриманий від спалювання деревини тополі
- ЕВ – Evans blue, фарба Еванс синій
- FITC – fluorescein isothiocyanate
- Р1 – препарат, отриманий від спалювання деревини сосни
- Р2 – препарат, отриманий від спалювання гілля сосни
- PES – препарат, отриманий від спалювання торфу
- PM – particulate matter, тверді наночастинки-забруднювачі
- PVDF – polyvinylidene fluoride

ВСТУП

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) щороку забруднення повітря є причиною майже семи мільйонів смертей у всьому світі і посідає 13-е за поширеністю місце серед причин загальної смертності [1]. Дев'ять з десяти людей дихають повітрям, яке перевищує норми ВООЗ щодо забруднюючих речовин, причому найбільше страждають ті, хто живе в країнах, що розвиваються [2]. Забруднення повітря може відбуватися будь-якими хімічними, фізичними або біологічними агентами, які змінюють природні характеристики атмосфери.

Низка сучасних досліджень показала, що забруднення повітря може сприяти розвитку запальних захворювань кишечника (ЗЗК), розповсюдженість яких є наразі глобальною проблемою охорони здоров'я [3]. Дедалі більше уваги звертають саме на забруднення повітря твердими частинками, які можуть опосередковано осідати в ротоглотці через мукоциліарний кліренс чи при ковтанні слини та слизу і здатні змінювати епітелій шлунково-кишкового тракту та мікробіом кишечника [4]. Всесвітня гастроентерологічна організація попереджає, що до 2050 року від епідеміологічних зрушень у ЗЗК, спричинених зміною середовища, постраждають більше 100 мільйонів людей [1, 5]. Проте на даний момент залишаються невідомими механізми дії твердих частинок повітря на цілісність кишкового бар'єру та мікробіому кишечника після їх потрапляння до шлунково-кишкового тракту.

Метою роботи було дослідження впливу карбонвмісних наночастинок диму природних попередників на стан кишкового бар'єру та сприйнятливості до розвитку запальних розладів кишечника.

Для досягнення мети були встановлені наступні завдання:

1. порівняти ефект різних карбонвмісних наночастинок диму, отриманих від згоряння різних порід деревини та деревних компонентів, на

функціональний стан епітеліального препарату товстої кишки щурів *in vitro*;

2. оцінити здатність карбонвмісних наночастинок найбільш токсичного диму порушувати цілісність слизової оболонки товстої кишки щурів та викликати запальні реакції;
3. дослідити вплив карбонвмісних наночастинок найбільш токсичного диму на сприйнятливність до розвитку хімічно-індукованого запалення кишечника після введення твердих наночастинок-забруднювачів повітря щурам через шлунковий зонд або внутрішньовенно.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика твердих частинок як компонентів забрудненого атмосферного повітря

Забруднення повітря – це складна суміш газоподібних і твердих компонентів, кожен з яких має згубний вплив на серцево-судинну та дихальну системи [6]. Забруднення повітря називають також причиною розвитку ішемічної хвороби серця, інсульта, хронічної обструктивної хвороби легень, раку легенів і гострих респіраторних інфекцій нижніх дихальних шляхів у дітей [7]. Крім того, екстремальні погодні явища та забруднення повітря впливають на інфекційні захворювання через воду, їжу, комах-переносників та гризунів [8].

Склад забруднення повітря сильно варіюється в залежності від джерела, швидкості викидів, а також умов сонячного світла та вітру. Газоподібні компоненти забруднення повітря включають діоксид азоту (NO_2), оксид азоту (NO), діоксид сірки (SO_2), озон (O_3) та окис вуглецю (CO) [9-11]. Тверді частинки (**p**articulate **m**atter, PM) – це загальний термін, який використовується для позначення компонентів забрудненого повітря, які складається з вуглецевмісних частинок з супутніми адсорбованими органічними хімічними речовинами та реакційноздатними металами. Загальні компоненти PM включають нітрати, сульфати, поліциклічні ароматичні вуглеводні, ендотоксин та метали, такі як залізо, мідь, нікель, цинк і ванадій [9, 10, 12, 13].

1.1.1. Класифікація твердих частинок

За розміром частинок РМ підрозділяється на (рис.1.1):

- а) грубі (PM10, діаметр <math><10\text{ мкм}</math>);
- б) дрібні (PM2,5, діаметр <math><2,5\text{ мкм}</math>);
- в) наддрібні (PM0,1, діаметр <math><0,1\text{ мкм}</math>).

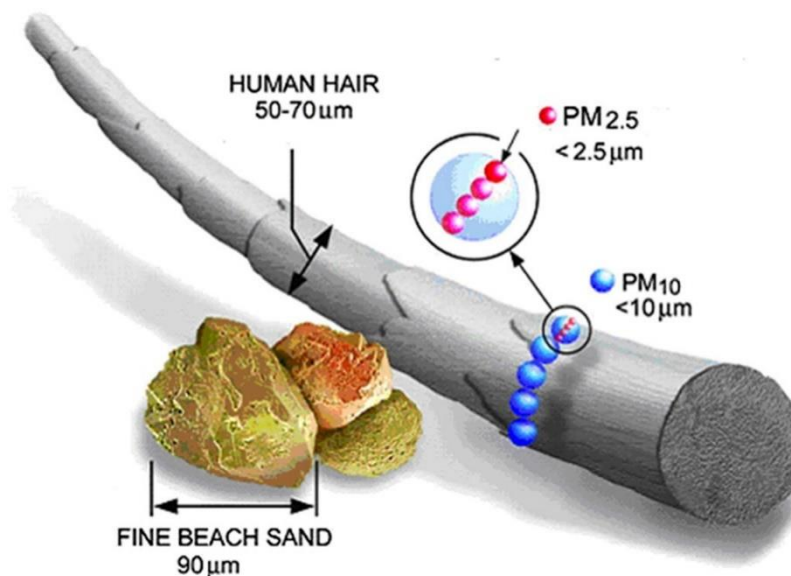


Рис. 1.1. Порівняння розмірів PM2,5 і PM10 із середнім діаметром волосини людини (~70 мкм) і дрібного пляжного піску (~90 мкм). [14]

Грубі частинки походять із численних природних та промислових джерел і, як правило, не проникають за межі верхніх бронхів. Дрібні та наддрібні частинки утворюються в результаті згоряння викопного палива і представляють більшу загрозу здоров'ю ніж крупні частинки, оскільки вони проникають у малі дихальні шляхи та альвеоли [11, 12, 15, 16]. Хоча органічні та металеві компоненти частинок змінюються залежно від місця розташування, рівні PM2,5 постійно корелювали з негативними серцево-судинними наслідками незалежно від місця розташування [10]. Порівняння загальних властивостей, що відрізняють дрібні і крупні частинки, підсумовано в таблиці 1.1. Дрібні частинки діаметром менше 0,1 мкм все ще знаходяться на ранніх стадіях досліджень [17].

Таблиця 1.1

Порівняння базових властивостей твердих частинок враховуючи розмір частинок: дрібні (PM_{2.5}) та грубі (PM₁₀) варіанти частинок

Характеристика	Дрібні частинки	Грубі частинки
Діаметр	Менше за 2.5 мкм	Менше за 10 мкм
Склад	Сульфат SO ₄ ²⁻ , нітрат NO ₃ ⁻ , амоній NH ₄ ⁺ , водневий йон H ⁺ , елементний вуглець С, органічні молекули, поліароматичні вуглеводні, метали Pb, Cd, V, Ni, Cu, Zn, зв'язана з частинками вода, біогенна органіка	Ресуспендований пил, ґрунтовий пил, вуличний пил, вугільна та нафтова летюча зола; оксиди металів Si, Al, Mg, Ti, Fe, CaCO ₃ , NaCl, морська сіль; пилок, спори плісняви та частини рослин
Джерело	Спалювання вугілля, нафти, бензину, трансформаційні продукти з NO _x , SO ₂ і органіки, включаючи біогенну органіку, наприклад терпени; високотемпературні процеси; плавильні та сталеплавильні заводи	Ресуспензія ґрунту з доріг та вулиць, суспендування ґрунтів які порушуються фермерством, шахтарством; ресуспензія промислового пилу; будівництво, спалення вугілля та нафти; океанічний аерозоль
Термін життя	Від днів до тижнів	Від хвилин до годин
Відстань (у км)	Від 100 до 1000	Від 1 до 10

Через свій малий розмір дрібні частинки мають тенденцію перебувати у повітрі протягом тривалих періодів часу (тижнів або місяців) і можуть транспортуватися на сотні або навіть тисячі кілометрів. Якщо є зміни в характері вітру та стабільності атмосфери, концентрації різних фракцій РМ можуть сильно коливатися від дня до дня (або навіть від години до години) [18].

За походженням тверді частинки можуть як бути прямими викидами у повітря, так і перетворюватися з газоподібних попередників (таких як діоксид сірки, оксиди азоту, аміаку та неметанових летких органічних сполук), що виділяються з антропогенних та з природних джерел [19]. Антропогенні

джерела дуже різноманітні і включають спалювання твердого палива (вугілля, буре вугілля, нафта та біомаса) у промисловій і сільськогосподарській діяльності, розмивання дорожнього покриття внаслідок дорожнього руху та стирання гальм і шин [20]. Природні джерела включають вулкани, пилові бурі, лісові пожежі, і морські бризи [21].

Нерідко виявляють, що рівень концентрації РМ у приміщенні перевищують показники довкілля. Утворення РМ у приміщенні відбувається за звичної активності, наприклад, приготування їжі, ходіння по килиму. Крім того джерелом можуть стати домашні тварини, побутові товари, які утворюють рідкі аерозолі (наприклад, дезодорант), і офісне обладнання (наприклад, принтери і копіювальні апарати) [22].

1.1.2. Хвороби, спричинені забрудненням повітря твердими частинками

Забруднення повітря має найбільший негативний вплив на здоров'я людини серед усіх проблем, що пов'язані із навколишнім середовищем. Воно впливає на людей у країнах як з низьким та середнім, так і з високим рівнем доходу.

Люди, які живуть у країнах із низьким і середнім рівнем доходу, найбільше відчувають забруднення повітря на своєму здоров'ї: 91% (з 4,2 мільйонів) передчасних смертей припадає на ці країни.

Короткочасна дія твердих частинок має негайний вплив на стан серцево-судинної системи, а їх тривалий вплив скорочує очікувану тривалість життя на місяці чи навіть роки [10, 23]. РМ₁₀ та РМ_{2,5} (або менше) є основними складовими забруднення міського повітря і визнані факторами ризику смертності [24-28].

Дослідження в широкому діапазоні географічних регіонів вказують на те, що кожні 10 мкг/м³ підвищення концентрації дрібних частинок в

навколишньому середовищі щодня збільшує смертність приблизно на 1-5% [24, 25, 29-31].

З'являється дедалі більше доказів, що демонструють зв'язок між забрудненням атмосферного повітря та ризиком серцево-судинних захворювань, таких як нерегулярне серцебиття, судинна дисфункція та аритмія, включно з дослідженнями з дуже забруднених районів. Повідомляється також, що тверді частки підвищують ризик респіраторних захворювань, таких як загострення астми та хронічна обструктивна хвороба легень [32].

Дослідження 2013 року, яке було проведене Міжнародним агентством з дослідження раку (IARC) ВООЗ, прийшла до висновку, що забруднене повітря на вулиці є канцерогенним для людей [33, 34]. Насамперед, воно базувалось на механістичних та епідеміологічних дослідженнях які показували зв'язок із раком легень. Причому забруднення повітря саме твердими частинками найбільш тісно пов'язане із збільшенням захворюваності на рак. Також спостерігається зв'язок між забрудненням зовнішнього повітря та збільшенням раку сечовивідних шляхів/сечового міхура [1].

Забруднення повітря також було пов'язане з інсультом та порушенням когнітивних функцій [35-37], а нейровізуалізація показала зв'язок із зниженим об'ємом білої речовини мозку [38]. Забруднення навколишнього повітря може бути непрямим мутагенним/канцерогенним через оксидативний стрес або викликати запалення, але також може бути прямим мутагенним і може досягати органів за межами дихальних шляхів [39, 40].

Забруднення повітря та тверді частинки є постійними джерелами нейрозапалення та тісно пов'язані з патогенезом захворювань ЦНС [40-42]. Крупні частинки (PM10) мають тенденцію захоплюватися у верхніх дихальних шляхах (рис. 1.2), тоді як дрібні (PM2,5) і наддрібні (PM0,1) фракції можуть досягати глибоких отворів легенів[43]. Наддрібні PM відкладаються в альвеолах і можуть проникати в інтерстицій і кров, де вони здатні викликати системні ефекти [44][45]. Крім того, наддрібні PM можуть безпосередньо

проникати через нюховий епітелій і потрапляти в ЦНС [40, 41]. Саме через такі властивості забруднення повітря РМ дедалі частіше пов'язують із посиленням прогресування нейродегенеративних процесів в основі хвороби Альцгеймера і хвороби Паркінсона [46-48].

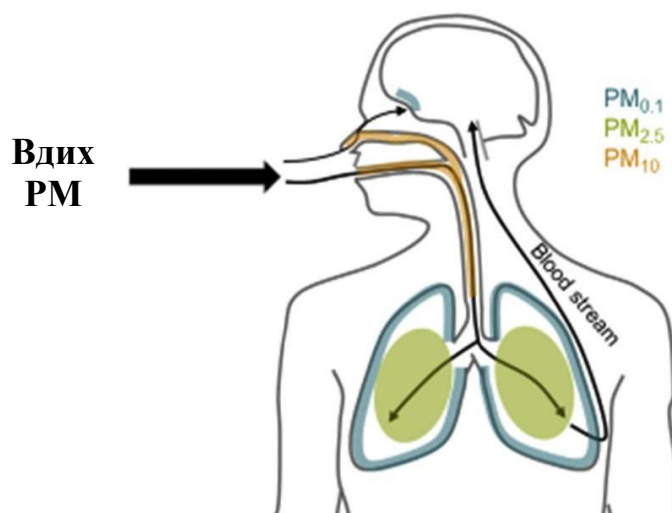


Рис.1.2. Зображення ділянок первинного відкладення твердих частинок (РМ) в організмі та потенційних шляхів впливу на ЦНС.

1.2 Загальна характеристика запальних захворювань кишечника

Запальні захворювання кишечника – це група хронічних захворювань, що спричиняють запалення шлунково-кишкового тракту. За даними ЕССО (European Crohn's and Colitis Organization) близько 2,2 млн людей у Європі (5 млн у всьому світі) страждають на цю групу захворювань. Хвороба Крона (ХК) та виразковий коліт (ВК) – це дві найбільш поширені форми запальних захворювань кишечника (табл.1.2) [49].

Таблиця 1.2

Порівняльна характеристика найбільш поширених форм ЗЗК

Ознаки	Виразковий коліт	Хвороба Крона
<i>Клінічні</i>		
Кров'яниста діарея	90-100%	50%
Пухлиноподібні утворення у черевній порожнині	Дуже рідко	Часто
Періанальна локалізація	Не буває	30-50%
Колоноскопія: наявність проктиту	100%	50%
Гістологія: розповсюдження	Слизова оболонка	Трансмуральне
Клітинні інфільтрати	Поліморфноядерні	Лімфоцитарні
Зменшення келихоподібних клітин	Часто	Відсутнє
Гранулеми	Відсутні	Мають діагностичне значення
<i>Рентгенологічні</i>		
Розповсюдження	Дифузне	Сегментарне
Симетрія	Є	Відсутня
Виразки	Поверхневі	Глибокі
Структури	Дуже рідко	Часто
Свищі	Дуже рідко	Часто

Кількість пацієнтів з хворобою Крона в Україні достеменно невідома, оскільки не створено реєстру. На думку експертів, орієнтовна кількість хворих на ХК в Україні складає 13 800 (30,33 на 100 000 населення), з них – пацієнтів з середнім та важким ступенем активності 6,6 тис (48%). У 2013 році в Україні зареєстровано 9 421 хворий на виразковий коліт (20,8 на 100 000 населення). Відмічається тенденція до росту числа тяжких, резистентних до лікування форм хронічних запальних захворювань кишечника (ХЗЗК), ускладнень та оперативних втручань, що призводять до інвалідизації пацієнтів молодого, працездатного віку.[49]

За останнє десятиліття, з моменту публікації останнього керівництва американського Коледжу гастроентерології (ACG) на цю тему, лікування виразкового коліту стає дедалі складнішим. Крім того, алгоритми ініціації, оптимізації та моніторингу реакції на існуючі методи лікування зазнали значної еволюції. ВК є хронічним імуніопосередкованим запальним станом товстої кишки, яка пов'язана із запаленням прямої кишки, але часто поширюється проксимально, охоплюючи додаткові ділянки товстої кишки [50]. ВК характеризується симптомами запалення прямої кишки, а саме: кровотеча, невідкладність і тенезми (відчуття тиску). Цей стан може виникнути в будь-який час і в будь-якому віці, але є переважний віковий розподіл початку, що досягає піку між 15 і 30 роками. Характер активності захворювання часто описується як рецидивно-ремітуючий із симптомами активного захворювання, що чергується з періодами клінічного спокою – ремісією. Деякі пацієнти з ВК мають стійку активність захворювання, незважаючи на діагностику та медикаментозну терапію, а у невеликої кількості пацієнтів спостерігається швидкий початок прогресуючого типу коліту, відомого як фульмінантна хвороба [51, 52]. ВК викликає значну захворюваність і описану низьку смертність[53, 54]. Пацієнти з активним захворюванням частіше мають супутні психологічні стани, такі як тривога та депресія і більш імовірно, що вони мають порушення соціальної взаємодії [55]. Тривалий ВК також асоціюється з певним ризиком дисплазії та

колоректального раку, які, як вважають, пов'язані з тривалим неконтрольованим запаленням [56-59].

Хвороба Крона - це хронічне запальне захворювання, яке вражає шлунково-кишковий тракт. Воно може викликати ураження від ротової порожнини до анального отвору і може призвести до позакишкових ускладнень [60]. Поширеність хвороби Крона зростає як серед дорослих так і серед дітей [61, 62]. Виявлено генетичну схильність до хвороби Крона, а також пов'язані з її розвитком специфічні фактори навколишнього середовища.[63, 64] Загальні симптоми включають діарею, біль у животі, ректальну кровотечу, лихоманку, втрату ваги, і втому. Пацієнти з хворобою Крона мають підвищений ризик розвитку раку, остеопорозу, анемії, дефіциту харчування, депресії, інфекцій і тромботичних явищ [60, 65].

1.3 Роль твердих частинок забрудненого повітря у розвитку запальних захворювань кишечника

Очищення від вдихуваних частинок навколишнього середовища тісно пов'язане з різними анатомічними структурами у легенях людини [66]. Під час вдиху легені діють як серійна система фільтрації та видаляє частинки з вдихуваного повітря. Крім того, дослідження на людях показали, що все більші частинки (N_6 мкм) швидко видаляються з легень і транспортуються в кишковий тракт шляхом мукоциліарного кліренсу – вродженого захисного механізму, який захищає легеневу систему від шкідливих наслідків вдихуваних агентів, у тому числі біологічної, хімічної та фізичної природи [3, 67-69]. Частинки, що вдихаються, осідають у війчастих дихальних шляхах і затримуються у товщі слизу. Цей вільно плаваючий слизовий гель покриває дихальний епітелій. Слиз транспортується проксимально за допомогою ритмічного удару війок до глотки, де він ковтається [70].

Оскільки основна маса РМ потрапляє в організм при вдиханні, дослідники використовували мічені радіоактивними речовинами частинки, щоб дослідити долю вдихуваних частинок у гризунів [71]. Вони виявили, що переважна більшість частинок (>95%) поглинається альвеолярними макрофагами, доводиться до ротоглотки шляхом мукоциліарного кліренсу і виводиться з калом [71]. До того ж РМ можуть потрапити в шлунково-кишковий тракт безпосередньо через проковтнуте повітря або через їжу, наприклад овочі та фрукти, які вкриті ними. Ці висновки припускають, що стаціонарні концентрації РМ у шлунково-кишковому тракті можуть бути подібними до тих, що зустрічаються в легенях [72].

Декілька досліджень безпосередньо досліджували зв'язок між забрудненням атмосферного повітря та ЗЗК, адже зростаюча індустріалізація пов'язана з паралельним зростанням обох. Нещодавні дослідження також показують зв'язок між забрудненням РМ та захворюваннями шлунково-кишкового тракту (ШКТ), в тому числі з апендицитом [73], колоректальним раком [74] та збільшенням кількості госпіталізації пацієнтів із ЗЗК [75].

Результати дослідження свідчать про те, що РМ можуть впливати на весь шлунково-кишковий тракт через зміни складу мікробіоти. Таким чином, можна постулювати, що вони відіграють роль або в ініціації, або в погіршенні існуючих проблем шлунково-кишкового тракту та метаболізму, у яких, як було показано, важливу роль відіграють зміни мікробіоти шлунково-кишкового тракту [4].

Крім того, дослідження показали, що РМ можуть збільшувати проникність епітелію через індукцію оксидативного стресу, який активує сигнальні шляхи, які, в свою чергу, сприяють вивільненню цитокінів і дисфункції бар'єру [72].

Вплив високих доз РМ також викликає окисно-залежну загибель епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту, порушення білків щільних з'єднань, запалення та підвищення проникності кишечнику *in vitro* та *in vivo* [72]. Збільшення проникності кишечника пов'язане з численними

захворюваннями, включаючи запальні захворювання кишечника, цукровий діабет та целиакію [76].

Індуковане твердими частинками збільшення проникності кишечника може мати значний внесок у посилення рівня системного запалення через нестримний приплив мікробних продуктів із кишечника до системного кровообігу [77].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Визначення найбільш токсичного препарату диму природнього походження

2.1.1 Лабораторні тварини та досліджувані речовини

В експерименті використовували самців щурів лінії Wistar масою 170-200 г ($n = 65$), які утримувались в акредитованому віварії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з нормами, встановленими законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 №3447-IV. Усі тварини утримувались за стандартних умов при температурі 22°C, освітленості 12 год на добу, вологості 30-35% та з таким раціоном харчування: повноцінний корм для лабораторних тварин К-12-4 з вільним доступом до води.

В усіх дослідах були використані реактиви фірми Sigma Aldrich (Німеччина), якщо не надано іншої інформації.

Під час аутопсії у тварин на відстані 1 см від анального отвору до цекуму вирізали товсту кишку, яку розрізали вздовж по брижейці та промивали у оксигенованому охолодженому розчині Кребса-Рінгера (117 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,2 мМ MgCl₂*6H₂O (1M), 25 мМ NaHCO₃, 1,2 мМ NaH₂PO₄*2H₂O (0,1M), 2,5 мМ CaCl₂). Потім у такому ж розчині відділяли м'язовий шар, залишаючи лише слизовий та підслизовий шари. У роботі використовували фрагменти проксимального відділу товстої кишки, яку поміщали в камеру Уссінга.

Досліджувався ефект препаратів наночастинок диму з деревини берези (B1), березової кори (B2), деревини тополі (C1), деревини сосни (P1), гілля сосни (P2), торфу (PES), отриманих від згоряння природних матеріалів, на стан кишкового бар'єру товстої кишки щурів. Для цього тварин було розподілено

по групам в залежності від препарату та концентрації речовини. Вихідна концентрація кожного препарату - 1 мг/мл. Зазначені препарати додавали до камери Уссінга таким чином:

I (n=5) – 100 мкл бідистиляту,

II (n=5) – 100 мкл препарату В1 (фінальна концентрація препарату 20 мкг/мл),

III (n=5) – 200 мкл препарату В1 (фінальна концентрація препарату 40 мкг/мл),

IV (n=5) – 100 мкл препарату В2 (фінальна концентрація препарату 20 мкг/мл),

V (n=5) – 200 мкл препарату В2 (фінальна концентрація препарату 40 мкг/мл),

VI (n=5) – 100 мкл препарату С1 (фінальна концентрація препарату 20 мкг/мл),

VII (n=5) – 200 мкл препарату С1 (фінальна концентрація препарату 40 мкг/мл),

VIII (n=5) – 100 мкл препарату Р1 (фінальна концентрація препарату 20 мкг/мл),

IX (n=5) – 200 мкл препарату Р1 (фінальна концентрація препарату 40 мкг/мл),

X (n=5) – 100 мкл препарату Р2 (фінальна концентрація препарату 20 мкг/мл),

XI (n=5) – 200 мкл препарату Р2 (фінальна концентрація препарату 40 мкг/мл),

XII (n=5) – 100 мкл препарату PES (фінальна концентрація препарату 20 мкг/мл),

XIII (n=5) – 200 мкл препарату PES (фінальна концентрація препарату 40 мкг/мл).

2.1.2 Реєстрація електрофізіологічних характеристик у камері Уссінга

Метод реєстрації електрофізіологічних параметрів за допомогою камер Уссінга використовується при дослідженні бар'єрних властивостей товстої кишки щурів [78]. Система камер Уссінга (VCC MC6; Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) складається з двох півкамер, які постійно перфузуються. Між півкамерами розміщується слайдер із зразком тканини. Окрім цього до складу системи входить багатоканальний автоматичний фіксатор струму і напруги (рис. 2.1). Температура розчину в середині півкамер має бути сталою, на рівні 37°C. З цією метою камери закріплюють на водяній сорочці, підключену до циркуляційної водяної бані.

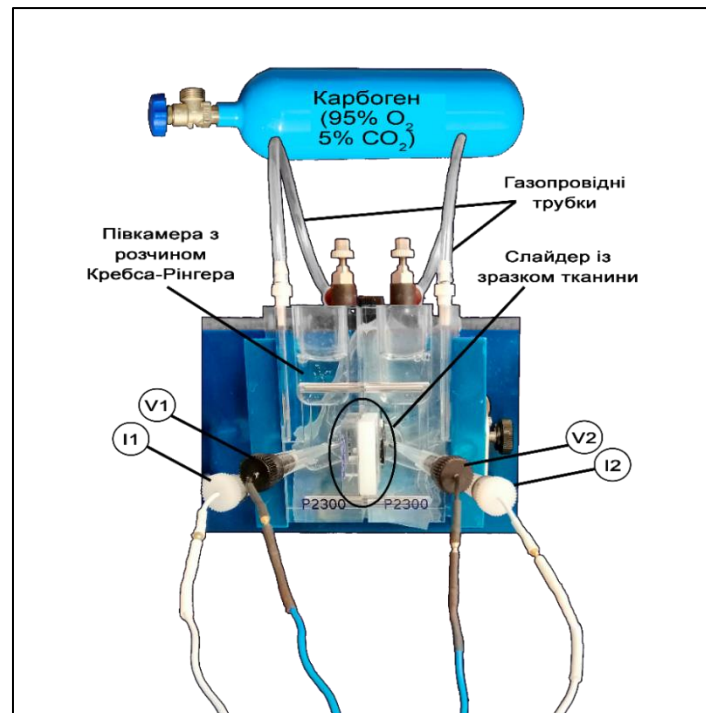


Рисунок 2.1 Будова камери Уссінга для дослідження електрофізіологічних характеристик епітелію кишечника.

I1 та I2 – електроди, на які подається струм

V1 та V2 – електроди для вимірювання напруги.

До кожної півкамери під'єднується газопровідна трубка. Ця трубка забезпечує оксигенацію та постійне значення рН тканини карбогеном (95% O₂, 5% CO₂). Також кожна півкамера має по одному отвору для електроду, на який подається струм (I₁, I₂) та електроду для вимірювання напруги (V₁, V₂).

Трансепітеліальна різниця потенціалів вимірювали за допомогою каломельних (Hg₂Cl₂) електродів, які були поміщені у насичений розчин хлориду калію. Вони пов'язані із середовищем для занурення тканин агар-КCl-містками. Серозна сторона тканини позначається як позитивна. Струм пропускали через хлор-срібні електроди (Ag/AgCl) в насиченому розчині KCl, які аналогічним чином з'єднували з рідиною для занурення тканин через агарові містки [79].

Перед початком кожного експерименту проводили калібрування зібраної установки без тканини. Для цього її заповнювали розчином Кребса-Рінгера і відтворювали умови такі ж, як у експерименті (температура розчину рівна 37°C, при постійна оксигенації карбогеном). Під час калібрування виконували компенсацію різниці потенціалів на електродах V₁ та V₂ і компенсацію електричного опору розчину. Після цього установку збирали заново, із досліджуваним зразком тканини у слайдері.

Фрагменти тканини (0,5 см²) кріпили на слайдери таким чином, щоб тканина була натягнута, але при цьому все ще була цілою. Для виключення пошкоджених зразків, цілісність тканини перевіряли додатково, використовуючи бінокляр.

Слайдери поміщали вертикально у спеціальний отвір між півкамерами з однаковою мукозо-серозною орієнтацією в усіх дослідах. Півкамери заповнювали розчином Кребса-Рінгера (по 5 мл у кожній). До півкамери, в якій омивається апікальна сторона, додавали 10мМ/л маніту, а до півкамери, в якій омивається латеральна сторона, – 10мМ/л глюкози для осмотичної рівноваги.

Реєстрацію току короткого замикання проводили в умовах фіксації напруги на 0 мВ. Трансепітеліальну резистентність реєстрували кожні 10 секунд як відповідь на біполярний імпульс 3 мВ тривалістю 200 мс.

З огляду на площу досліджуваної тканини, отриману величину нормалізували на площу в один квадратний сантиметр тканини ($\text{Ом} \cdot \text{см}^2$).

Після того, як слайдер із фрагментом кишечника було вмонтовано в камеру, тканину залишали на 20 хвилин для адаптації до умов експерименту та стабілізації електрофізіологічних параметрів. На 21й хвилині з апікальної сторони відбирали об'єм розчину, еквівалентний об'єму відповідного препарату РМ диму або бідистиляту, який потім одразу додавали до тієї ж сторони.

Після завершення експерименту в обидві півкамери додавали $10 \mu\text{M}$ 1%-го розчину карбахоліну для перевірки життєздатності тканини.

2.1.3 Визначення парацелюлярної проникності серо-мукозального препарату товстої кишки щурів

Для визначення парацелюлярної проникності епітеліального бар'єру використовували маркер флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC)-декстран із молекулярною масою 4 кДа. Щоб отримати контрольні показники, через 40 хвилин запису експерименту з півкамери базолатеральної сторони відбирали двічі по 100 мкл розчину та переносили ці зразки на чорну плашку. На 41-й хвилині для підтримки сталого об'єму спочатку відбирали 500 мкл розчину з апікальної сторони, а потім додавали 500 мкл FITC-декстрана з фінальною концентрацією 2 мг/мл. Через 15, 30 та 60 хвилин запису з базолатеральної сторони відбирали по 100 мкл розчину у двох повтореннях та переносили на чорну плашку. Інтенсивність сигналу FITC-декстрану у набраних зразках вимірювали за допомогою спектрофотометру Synergy HT (BioTek Instruments, USA) за довжини хвилі збудження 485 нм та довжини хвилі поглинання 528 нм.

Значення коефіцієнта проникності (P_{app}) виразили з рівняння Фіка та розраховували за наступною формулою [80]:

$$P_{app} = \frac{J}{\Delta C}, \quad (1)$$

Оскільки:

$$J = \frac{\vartheta}{A \cdot t}, \quad (2)$$

$$\vartheta = \frac{C_1}{V}, \quad (3)$$

$$\Delta C = (C_0 - C_1), \quad (4)$$

то:

$$P_{app} = \frac{C_1}{V \cdot S \cdot t \cdot (C_0 - C_1)}, \quad (5)$$

Де: J – густина потоку речовини (моль/см²*с);

C_0 – концентрація FITC-декстрану в розчині з серозного боку в початковий момент часу (моль/л);

C_1 – концентрація FITC-декстрану в розчині з мукозальної сторони через відповідний проміжок часу інкубації (моль/л);

V – об'єм розчину з мукозальної сторони мембрани (л);

S – площа досліджуваної ділянки тканини (см²);

t – час перенесення декстрану через мембрану.

З огляду на співвідношення 1 л = 1000 см³, розмірність проникності виражається в см/с.

2.2. Дослідження впливу наночастинок диму природного походження при експериментальному гострому коліті

2.2.1. Схема проведення дослідження

Самці білих лабораторних нелінійних щурів (180-200 г, $n = 48$) були розділені на 2 групи, з яких I отримувала синтезований препарат із твердими наночастинками-забруднювачами повітря (PM) природного походження, отриманими від згоряння деревини тополі (C1), II – контроль.

Введення відбувалося двома шляхами (рис. 2.2). Перший спосіб: досліджувану речовину вводили тваринам ($n = 28$) у хвостову вену з дозуванням 500 мкг/100 г маси тіла. Тваринам контрольної групи ($n = 14$) вводили 0,1 мл 0,9%-го розчину натрію хлориду.

Другий спосіб: препарат вводили щурам ($n = 20$) перорально у дозі 180 мкг/100 г маси тіла. Контрольна група ($n = 10$) отримувала перорально 0,3 мл фізіологічного розчину. Незалежно від способу введення, тварин умертвляли через 3 години після введення препарату шляхом цервікальної дислокації.

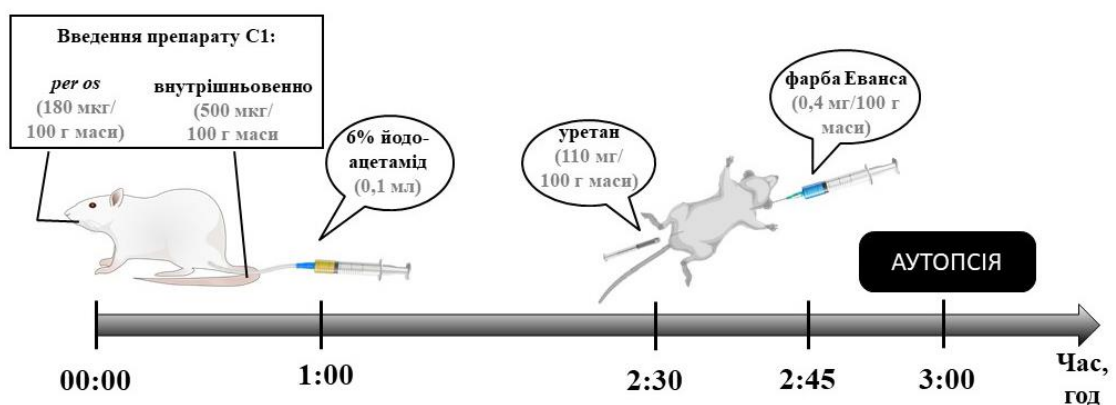


Рис.2.2. Схема проведення експерименту

2.2.2. Визначення проникності ендотелію товстої кишки щурів

Проникність ендотелію товстої кишки визначали з використанням фарби Еванс синій (ЕВ) [81]. Тварини були анестезовані уретаном (1,1 г/кг, внутрішньоочеревинне введення, «Sigma-Aldrich», США), після чого у яремну вену вводили 0,4%-й розчин ЕВ у дозі 0,4 мг/100 г тварини за 15 хв до аутопсії.

Товсту кишку (7 см, що відповідало ділянці для ендотеліальної проникності) видаляли, зшкрябували слизову оболонку та занурювали її в формамід. Інкубували 24 год, на шейкері при $T=50^{\circ}\text{C}$. Вимірювали оптичну густину рідини над осадом на спектрофотометрі при довжині хвилі 612 нм, як контроль використовувався формамід. Проникність ендотелію визначали за кількістю фарби в крові (мкг/г кишки).

2.2.3. Моделювання експериментального коліту у щурів

Кожну з двох груп тварин додатково було розділено на дві підгрупи. У першій підгрупі викликали експериментальний коліт одноразовим ректальним введенням (7 см від анального отвору за допомогою гумового катетеру S8 (Rüsch, Німеччина) 0,1 мл 6%-го розчину йодоацетаміду, розчиненого в 1%-му розчині метилцелюлози [82]. Щурам другої, контрольної підгрупи, вводили 0,1 мл 1%-го розчину метилцелюлози.

Під час експериментів з гострим колітом, його моделювали через одну годину після введення досліджуваних речовин. Щурів умиряли шляхом цервікальної дислокації через 2 години після ректального введення йодоацетаміду або метилцелюлози. Під час аутопсії зважували масу кишки в перерахунку на 100 г маси тварини (мг/100г тіла) та оцінювали набряк.

2.2.4. Визначення глікопротеїнів слизу методом реакції Шифа на PVDF-мембрані

Глікопротеїни (муцини) це основний високомолекулярний компонент слизу. Приблизно 60-80% маси молекули муцину складають глікани, які захищають муцини від деградації протеолітичними ферментами та впливають на їх гель-формуєчі властивості [83]. Реакція Шифа дозволяє визначати гліканову частину глікопротеїнів.

По 1 см товстої кишки було вирізано і занурено у підготовлені пробірки, у яких містилось по 3 мл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну («Sandoz», Швейцарія). Кожна пробірка була поміщена на вортекс, де перемішувалась впродовж 4 хв, після чого зразки центрифугували при 3000 g впродовж 15 хв. З пробірок відбирали надосад, при цьому у пробірці залишався осад та надосадова рідина із загальним об'ємом 1 мл. Вміст пробірок ресуспендували та гомогенізували на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (ІКА, Німеччина) при швидкості 5 (20500 rpm) впродовж 20 с.

Визначення глікопротеїнів поверхневого слизу проводили за допомогою реакції Шифа на полівініліденфторид (PVDF)-мембрані [84]. PVDF-мембрану занурювали послідовно у 100% розчин метанолу, а потім у 80% по 2 хв у кожний. Після цього мембрану промивали дистильованою водою, висушували та поміщали на фільтрувальний папір. Далі на PVDF-мембрану наносили 10 мкл гомогенізованого зразка поверхневого слизу та витримували 10-15 хв, щоб мембрана була повністю просякнута. Мембрану промивали дистильованою водою протягом 2 хв, після цього інкубували 10 хв в 0,5%-й розчині КОН у 70%-й етанолі та ще раз промивали дистильованою водою. Далі мембрану занурювали в 0,5%-й розчин періодатної кислоти на 10 хв, промивали дистильованою водою і піддавали дії реактиву Шифа (фуксинсірчаної кислоти) впродовж 30 хв при постійному струшуванні. Після цього мембрану двічі інкубували в 0,6%-му метабісульфіті натрію впродовж 3 хв і промивали дистильованою водою ще 3 хв. Далі мембрану висушували впродовж 10 хв та

сканували за допомогою сканера Canon PIXMA MP235. На отриманих зображеннях вимірювали щільність позитивно забарвлених точок за допомогою програмного забезпечення для обробки та кількісного аналізу зображень Image Studio™ Lite Ver 5.0 (LI-COR Biosciences, США.).

2.2.5. Визначення транслокації бактерій у кров

Тварини були анестезовані внутрішньоочеревинно за допомогою уретану з розрахунку 1,1 г/кг. Щурам була проведена лапаротомія в асептичних умовах, після якої відбирали 1 мл крові із ворітної вени та готували десятикратні розведення у стерильному фізіологічному розчині. Загальну кількість мікроорганізмів у крові виявляли методом посіву робочих розведень на 5%-й кров'яний агар. Кількість мікроорганізмів виражали у вигляді lg КУО в 1 мл крові (lg КУО/мл).

2.2.6. Визначення активності мієлопероксидази у слизовій оболонці товстої кишки

Інфільтрація імунних клітин у слизову оболонку кишечника у відповідь на подразнення товстої кишки є ключовою гістологічною ознакою ЗЗК [85]. Така вроджена імунна відповідь спрямована на усунення пошкоджень кишечника, проте нейтрофіли та моноцити, які накопичуються у стінці шлунково-кишкового тракту, беруть участь у патогенезі ЗЗК, виробляючи запальні цитокіни та активні форми кисню. Мієлопероксидаза (МПО) – це рясний гранулярний фермент, унікальний для нейтрофілів та моноцитів, який каталізує вироблення потужних активних форм кисню. Порушення регуляції виробництва активних форм кисню пов'язане з окислювальним

пошкодженням та запаленням і здатне потенціювати пошкодження слизової оболонки [86].

Для визначення активності мієлопероксидази (МПО) 20-30 мг слизової оболонки товстої кишки було гомогенізовано, перетираючи її у ступці з рідким азотом до утворення порошку. До гомогенізованого зразку додавали НТАВ (гексадецилтриметиламоній бромід) буфер із розрахунку 1 мл на 50 мг зразку, після чого переносили його у мікропробірку, яку витримували: 1 хв у рідкому азоті; 10 хв на водяній бані при температурі 37°C; пробу сонікували, зануривши в лід, протягом 10 секунд на ультразвуковому дезінтеграторі і центрифугували впродовж 15 хв (14 000 rpm, T = +4°C).

За допомогою спектрофотометра Synergy HT (BioTek Instruments, USA) при довжині хвилі 450 нм вимірювали оптичну густину. Для цього у лунки планшета вносили по 14 мкл супернатанту досліджуваних зразків і вносили по 200 мкл реакційного буфера (5*10⁻⁴% р-н H₂O₂ – 6,1 мл, р-н ODHC – 4,1 мл, фосфатний буфер – 4,4 мл). Вимірювання проводили через 10-15 хв після цього.

2.2.7. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету програми Prism v.9 (GraphPad Software, США). Нормальність розподілу перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлка. У випадках, коли гіпотеза нормальності відкидалася, показник вірогідності (P) розраховували на основі рангового непараметричного критерію Манна-Уїтні. В інших випадках розрахунок проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Отримані результати представлені у вигляді середнього (M) ± стандартне відхилення (SD). Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (p) приймався меншим за 0,05.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення токсичних властивостей препаратів наночастинок диму, отриманих з природніх попередників

3.1.1. Дослідження впливу препаратів наночастинок диму на електрофізіологічні характеристики епітелію товстої кишки

Досліджуючи електрофізіологічні характеристики епітелію товстої кишки стало видно, що показник трансепітеліальної резистентності значно зменшується, що зрозуміло з його реєстрації (рис 3.1 А). За 20 хвилин адаптування у контрольній групі тварин значення резистентності становило $89,67 \text{ Ом/см}^2$, ще за 20 хвилин цей показник зменшився на приблизно 10%, при цьому в кінці він вже був майже в два рази менший за значення на початку запису.

Подібні результати були отримані для інших груп, що отримували експериментальні речовини: В1 (20 мкг/мл), В2 (20 мкг/мл), В2 (40 мкг/мл), С1 (40 мкг/мл), Р1 (20 мкг/мл), Р2 (20 мкг/мл), Р2 (40 мкг/мл). Фінальні значення для груп, що отримували В1 (40 мкг/мл), Р1 (40 мкг/мл), а також PES (20 мкг/мл) і PES 40 мкг/мл), зменшились у більше ніж два рази. Проте для групи, що отримувала речовину С1 (20 мкг/мл), значення показника трансепітеліальної резистентності за весь час реєстрації залишалось найбільш сталим. Через 20 хв запису початкове значення $97,31 \text{ Ом/см}^2$ зменшилось на 12%, а за 80 хвилин зменшилось всього на 25% і становило $72,15 \text{ Ом/см}^2$.

Реєстрація струму короткого замикання, на відміну від значень трансепітеліальної резистентності, показала зростання цього показника (рис. 3.1 Б). За 100 хвилин запису це значення для контрольної групи, а також груп, що отримували препарати В2 (40 мкг/мл), Р1 (20 мкг/мл), PES (20 мкг/мл) і PES (40 мкг/мл), показало значне зростання (майже у два рази). А для груп, що

отримували препарати В1 (20 мкг/мл), В2 (20 мкг/мл), С1 (20 мкг/мл), С1 (40 мкг/мл), Р2 (20 мкг/мл), Р2 (40 мкг/мл) показники струму короткого замикання збільшились у півтора рази. Ці значення для груп, що отримували експериментальні речовини В1 (40 мкг/мл) та Р1 (40 мкг/мл) одразу після періоду адаптації становили 12,86 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ та 12,18 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, а в кінці експерименту становили вже 28,87 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ та 27,19 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ відповідно, що показує зростання відносно початку запису у 2,25 разів.

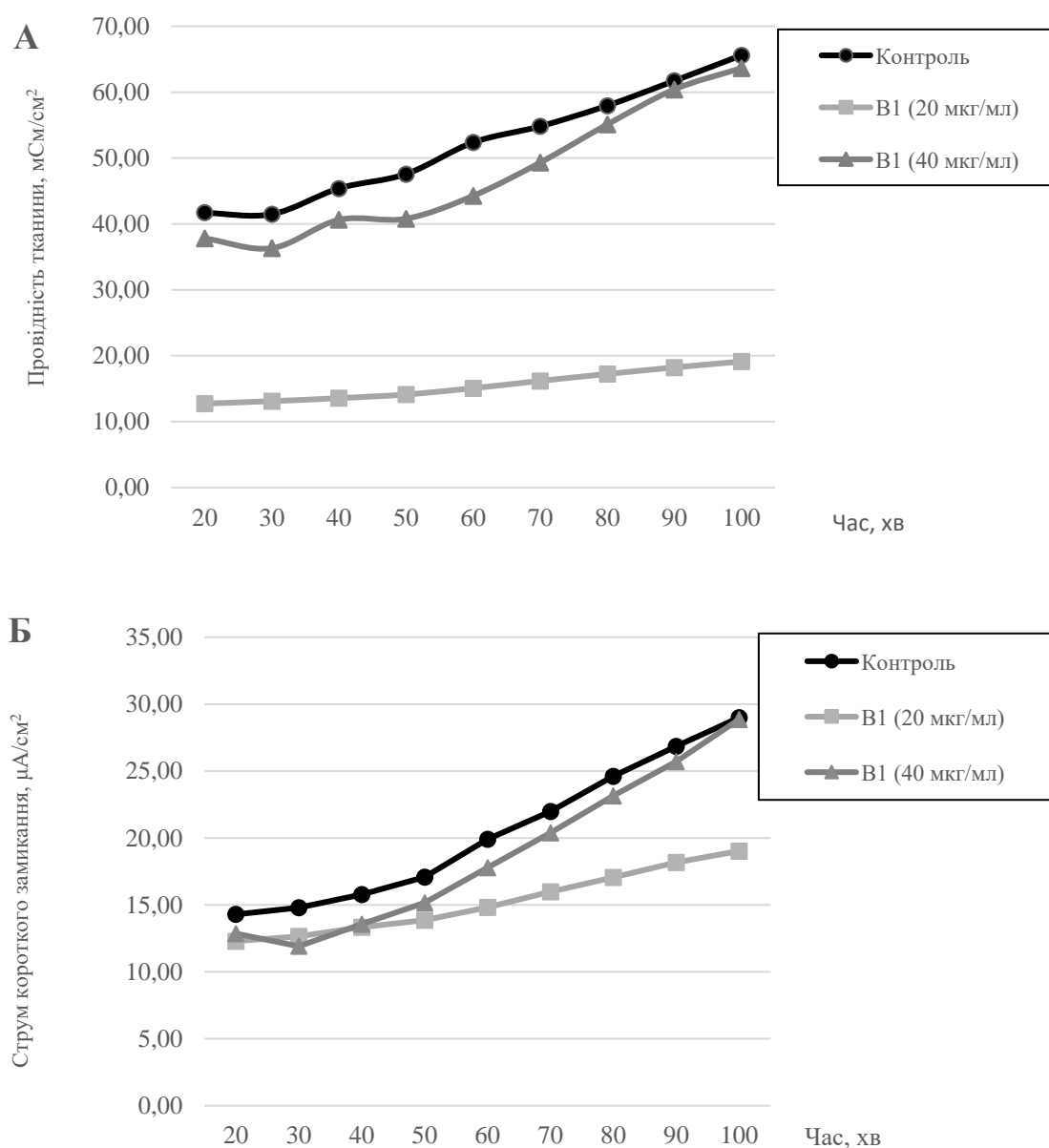


Рисунок 3.1 Дія препарату з наночастинками диму, отриманого від згорання деревини берези, у концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл на серо-мукозальний препарат товстої кишки щурів Wistar (n=5): (А) Зміни проникності тканини. (Б) Реєстрація струму короткого замикання.

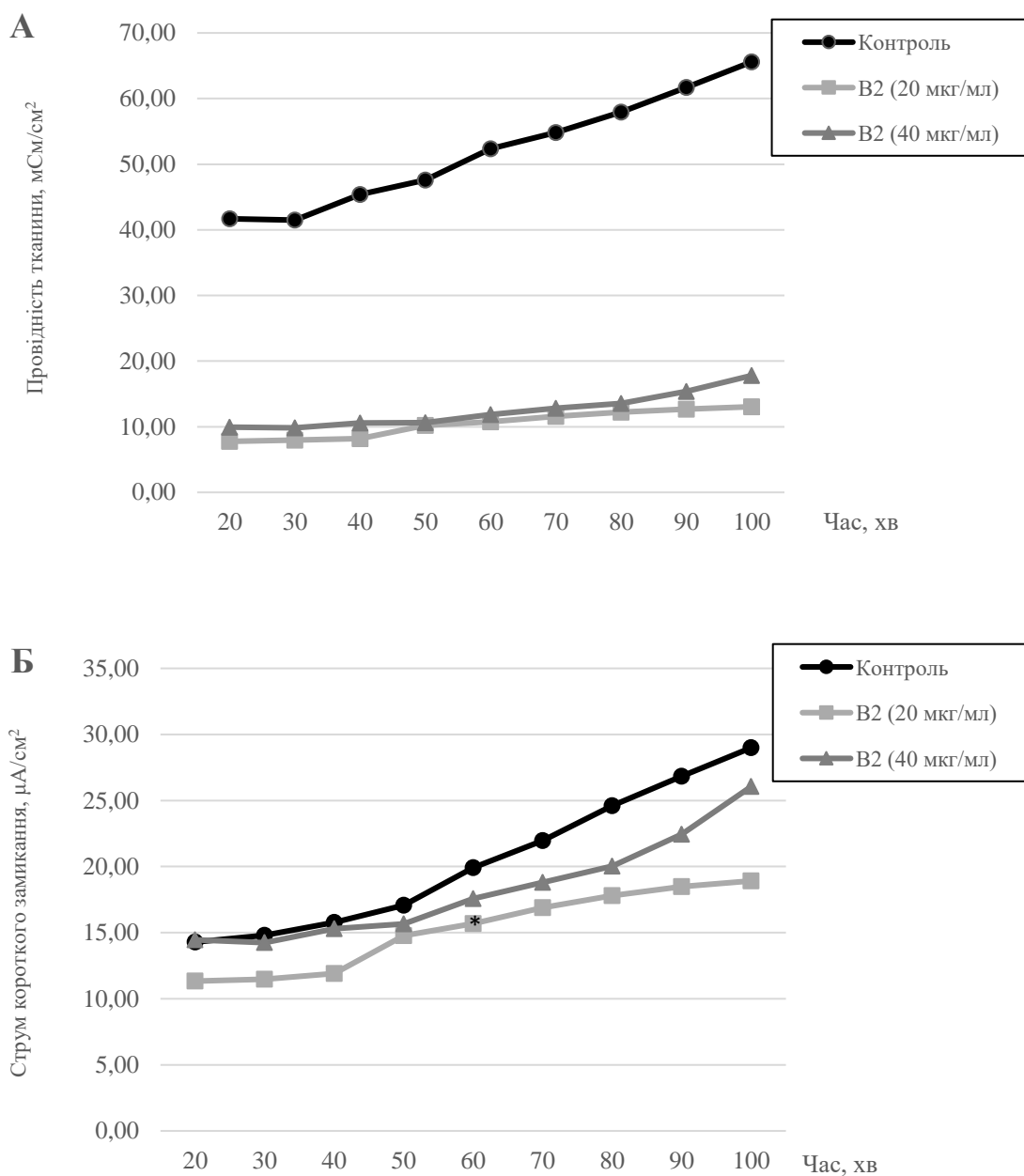


Рисунок 3.2 Дія препарату з наночастинками диму, отриманого від згорання кори берези, у концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл серо-мукозальний препарат товстої кишки щурів Wistar (n=5): (А) Зміни проникності тканини. (Б) Реєстрація струму короткого замикання.

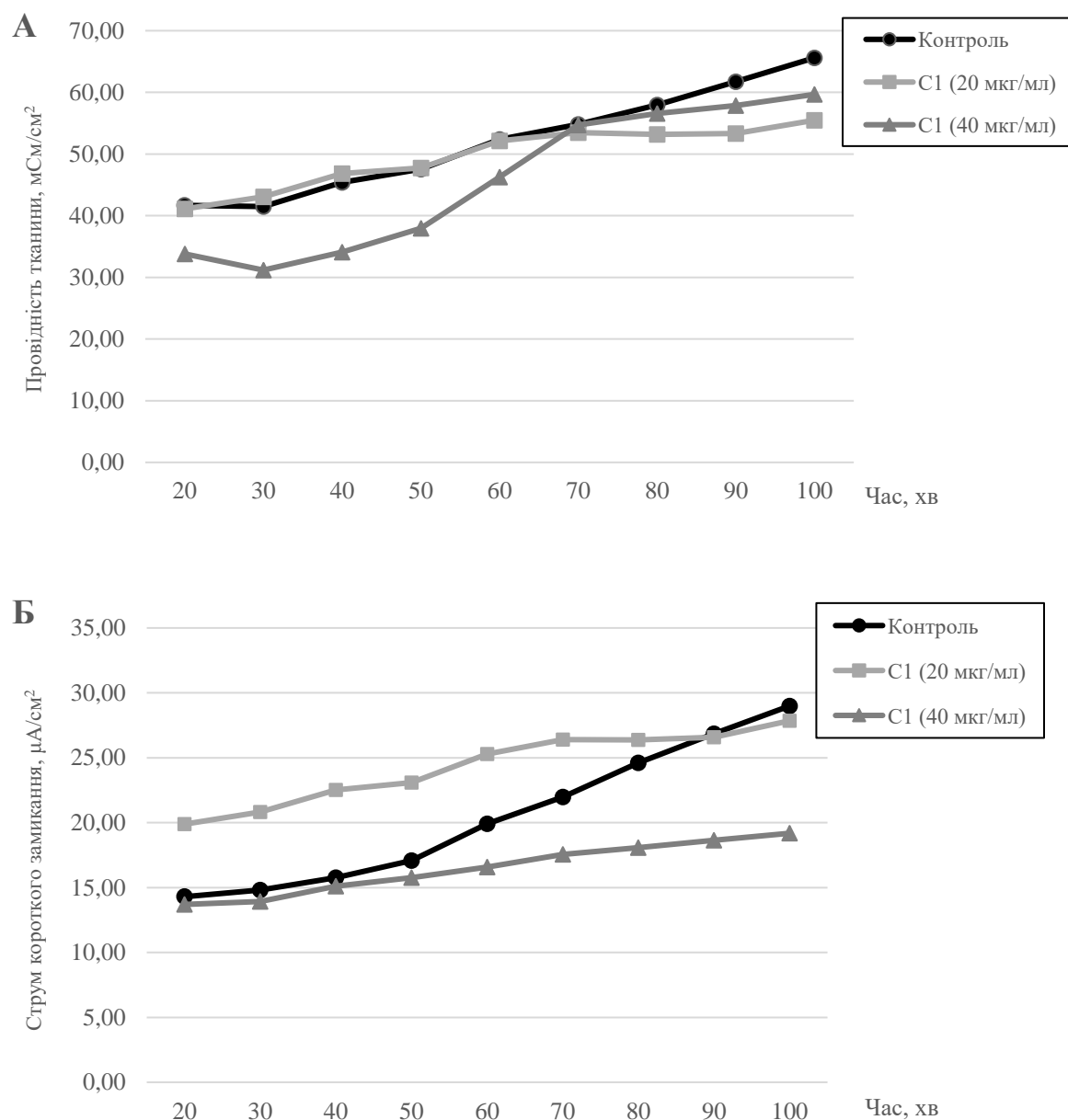


Рисунок 3.3 Дія препарату з наночастинками диму, отриманого від згорання з деревини тополі, у концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл серо-мукозальний препарат товстої кишки щурів Wistar (n=5): (А) Зміни провідності тканини. (Б) Реєстрація струму короткого замикання.

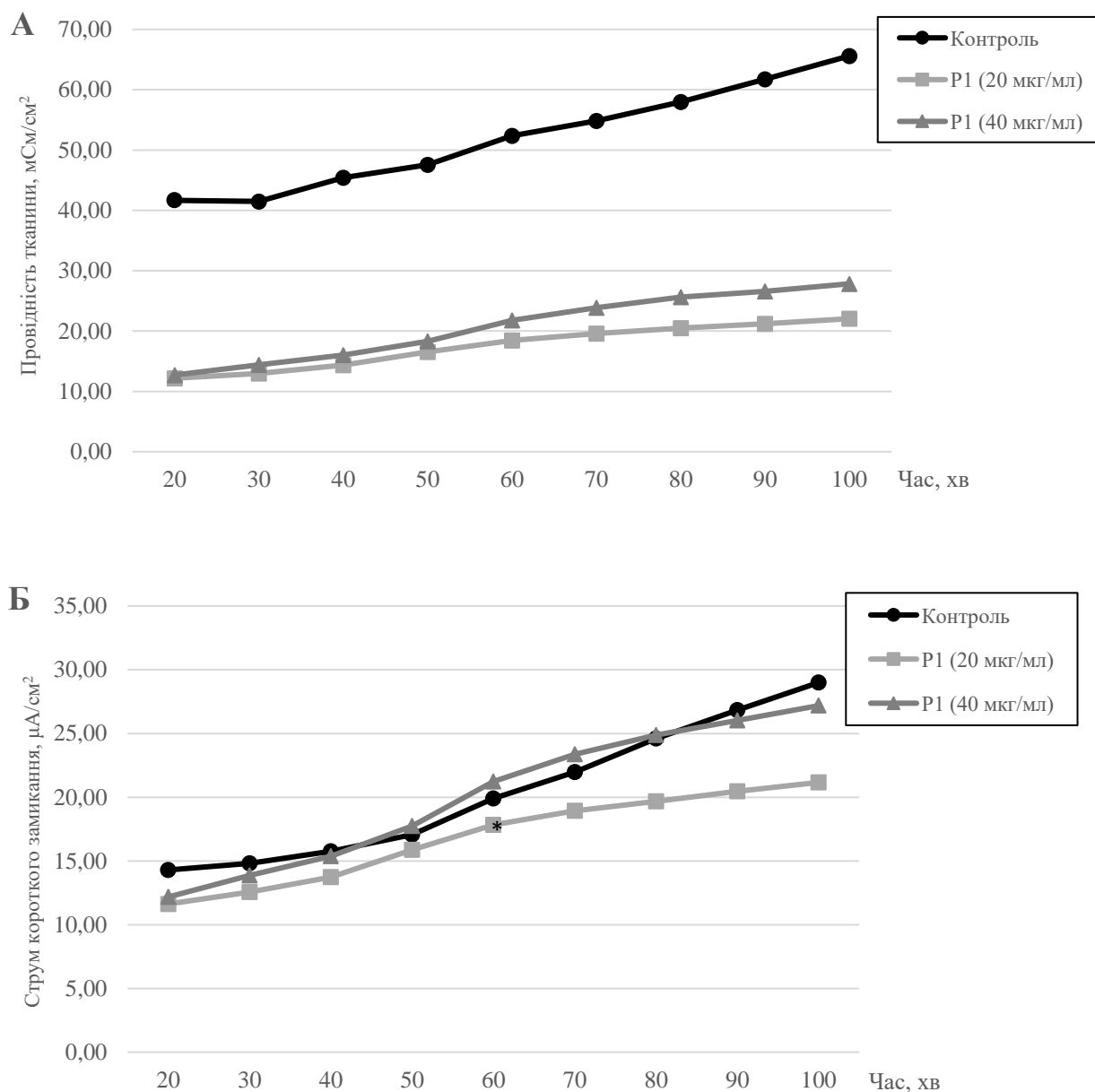


Рисунок 3.4 Дія препарату з наночастинками диму, отриманого від згорання деревини сосни, у концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл на серо-мукозальний препарат товстої кишки щурів Wistar (n=5): (А) Зміни провідності тканини. (Б) Реєстрація струму короткого замикання.

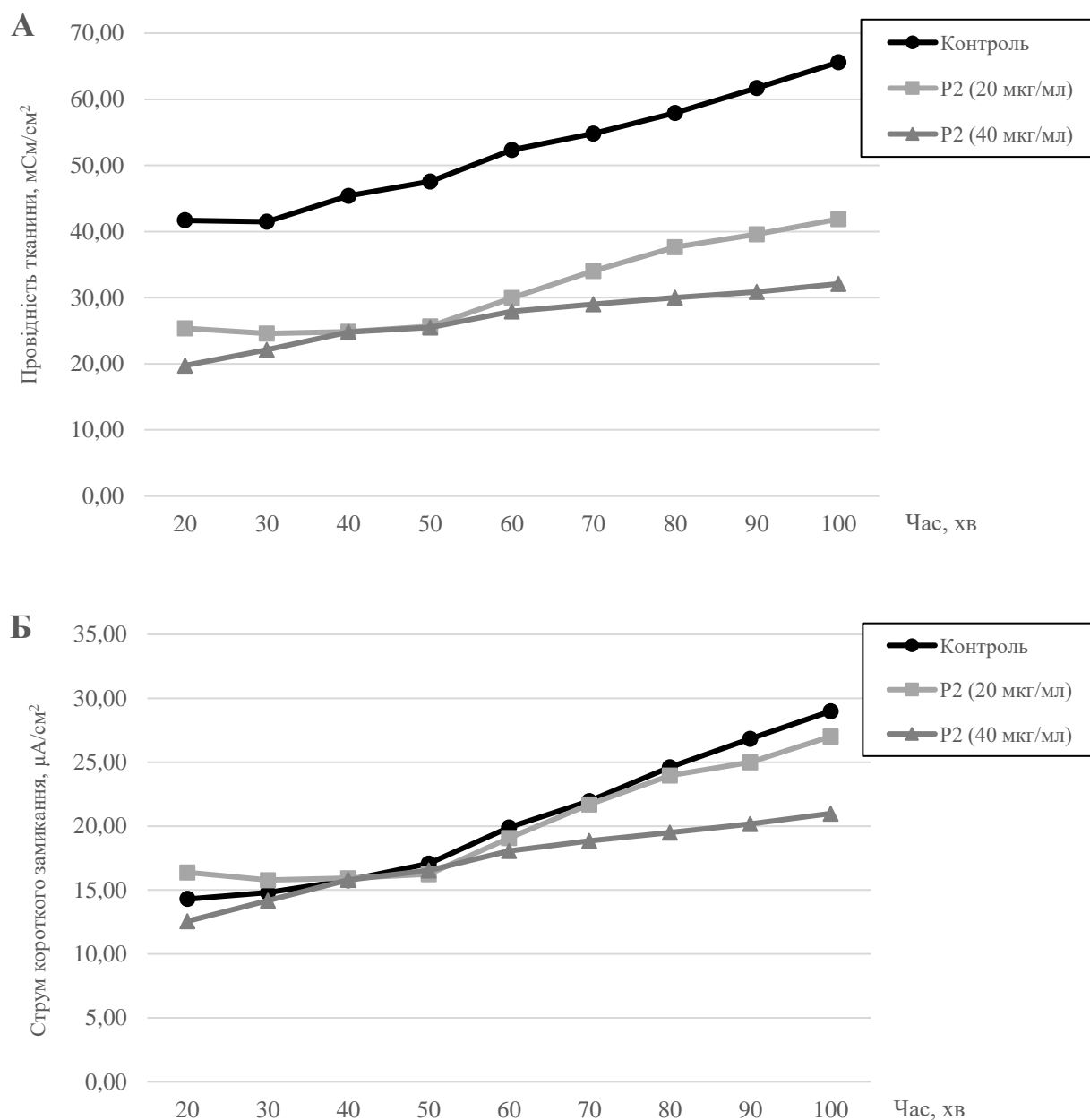


Рисунок 3.5 Дія препарату з наночастинками диму, отриманого від згорання гілля сосни, у концентрації 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ та 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ серо-мукозальний препарат товстої кишки щурів Wistar ($n=5$): (А) Зміни провідності тканини. (Б) Реєстрація струму короткого замикання.

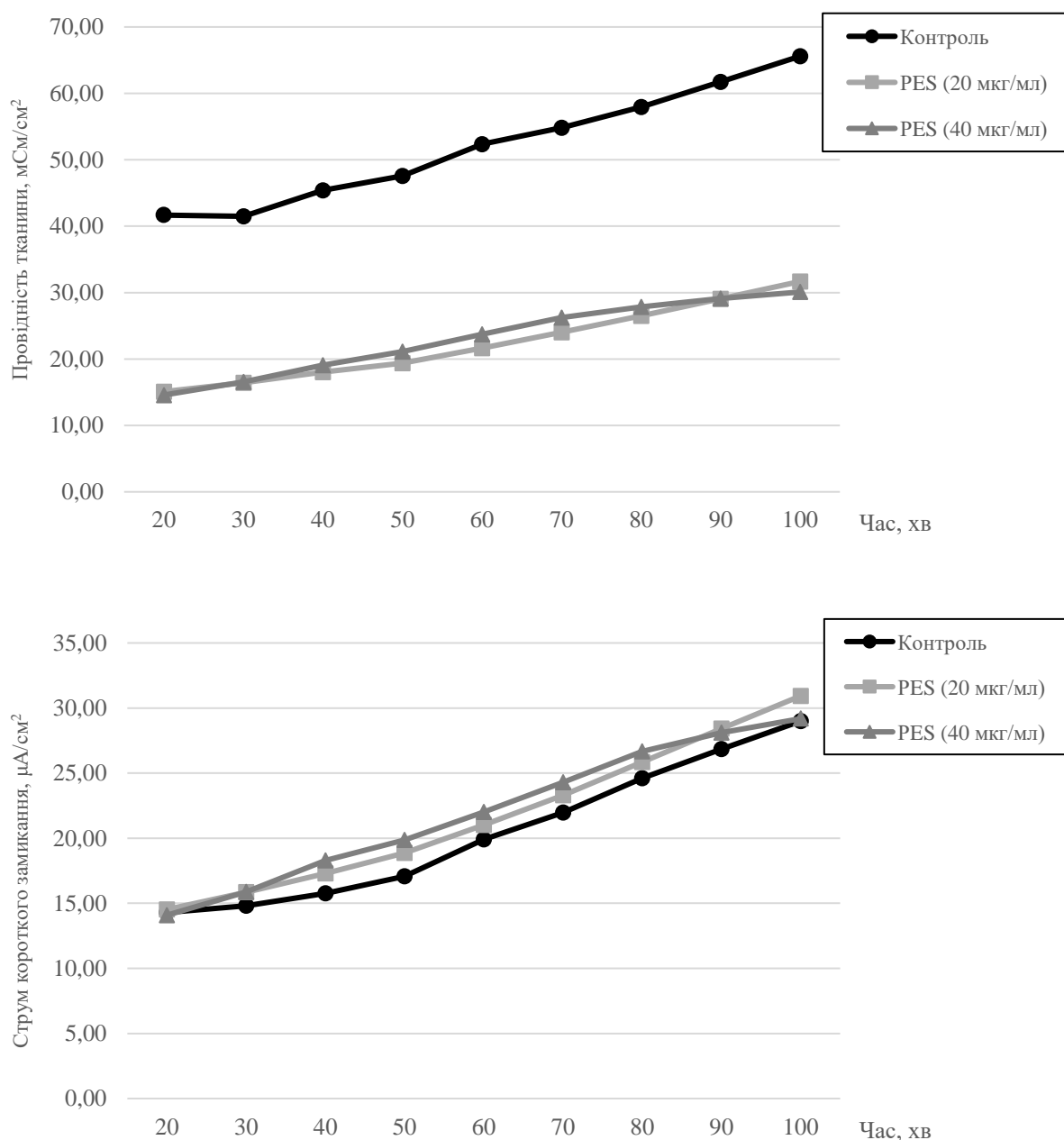


Рисунок 3.6 Дія препарату з наночастинками диму, отриманого від згорання торфу, у концентрації 20 мкг/мл та 40 мкг/мл серо-мукозальний препарат товстої кишки щурів Wistar (n=5): (А) Зміни провідності тканини. (Б) Реєстрація струму короткого замикання.

В усіх експериментах слизова поверхня стінки кишечника мала негативний заряд, що відповідає літературним даним [87]. Значення трансепітеліальної різниці потенціалів контрольної групи через 20 хвилин після додавання бідистиляту збільшилось з $-2,72 \text{ Ом/см}^2$ до $-1,3 \text{ Ом/см}^2$, але після цього залишалось майже сталим до кінця запису експерименту. Такі результати були характерними для більшості експериментальних груп, зокрема для обох концентрацій обох видів препаратів берези В1 та В2, концентрації 40 мкг/мл препарату С1, та обох концентрацій препарату Р2 та PES.

Узагальнюючи отримані результати, можна сказати, що досліджені карбонвмісні частинки диму можна поділити на 3 типи (табл.3.1).

Таблиця 3.1

Рівень зміни провідності тканини та струму короткого замикання серо-мукозального препарату товстої кишки щурів через 60 хв після додавання карбонвмісних частинок диму у порівнянні з контрольними показниками

Препарат диму	Різниця середніх значень експериментального та контрольного показників за 60 хв дії препарату			
	Провідність тканини		Струм короткого замикання	
	20 мкг/мл	40 мкг/мл	20 мкг/мл	40 мкг/мл
В1	3,362134	1,094041	1,342841	1,087889
В2	4,958441	4,167196	1,342585	1,119729
С1	1,049973	1,136855	0,842171	1,240662
Р1	2,968585	2,503968	1,21356	1,013363
Р2	1,652374	1,935334	1,017641	1,176444
PES	2,321419	2,248767	0,94004	0,928946

Перший тип – ті, які зменшують провідність серо-мукозального препарату в концентрації 20 мкг/мл, що свідчить про зменшення іонної провідності тканини і асоціюється зі зменшенням електрогенного транспорту

аніонів (зменшення струму короткого замикання) але цей ефект зменшується при переході до концентрації 40 мкг/мл. Препарати які підпадають під цей опис $P1 < B1 < B2$;

Другий тип – ті, які зменшують провідність серомукозального препарату із залежністю від дози, тобто із переходом від 20 мкг/мл до 40 мкг/мл ефект зростає, що асоціюється зі зменшення електрогенного транспорту аніонів. До цих препаратів належать $P2 < C1$;

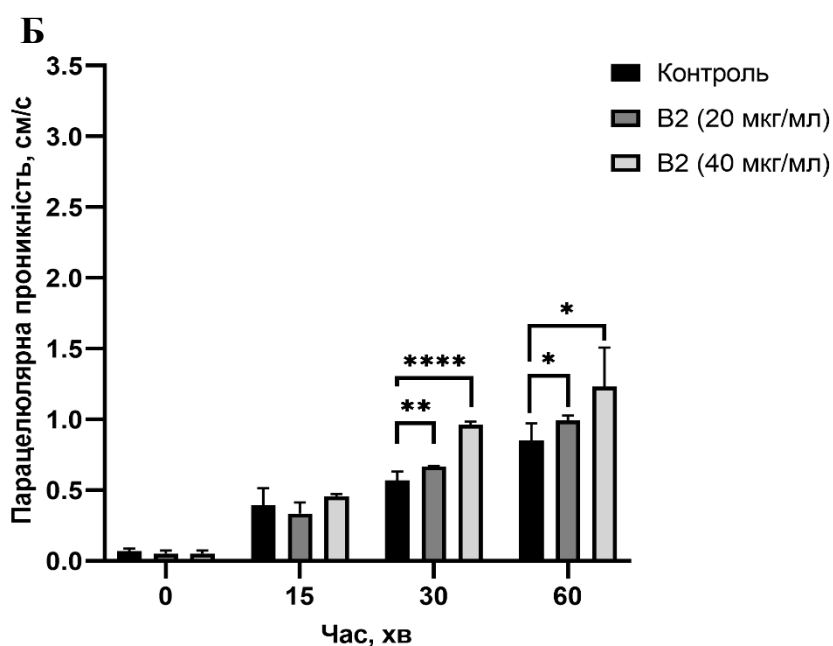
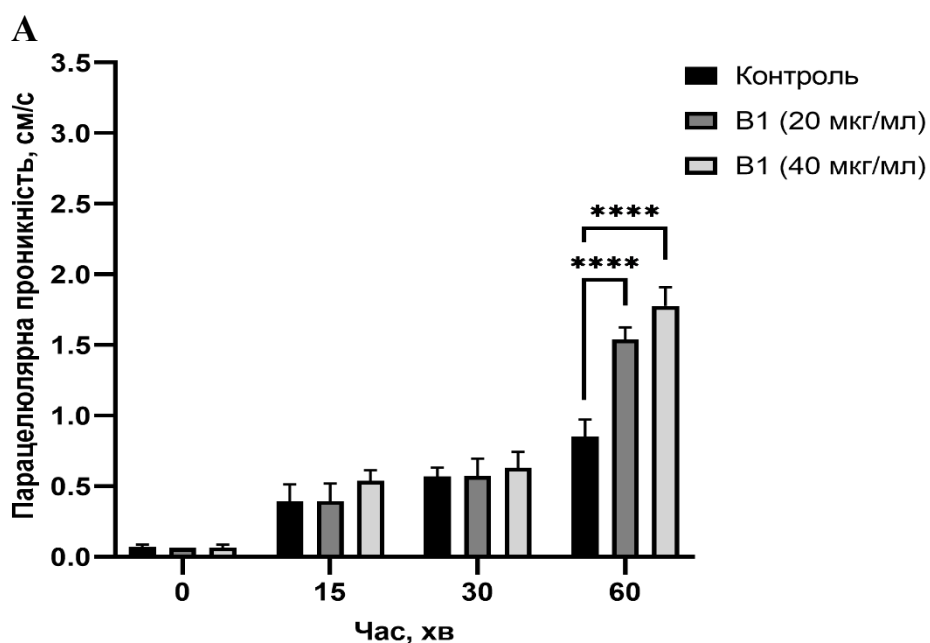
Третій тип – ті, які також мають дозозалежний, але різнонаправлений ефект, тобто зменшують провідність серомукозального препарату, при цьому незначно збільшуючи електрогенний транспорт аніонів. До третього типу належить препарат PES.

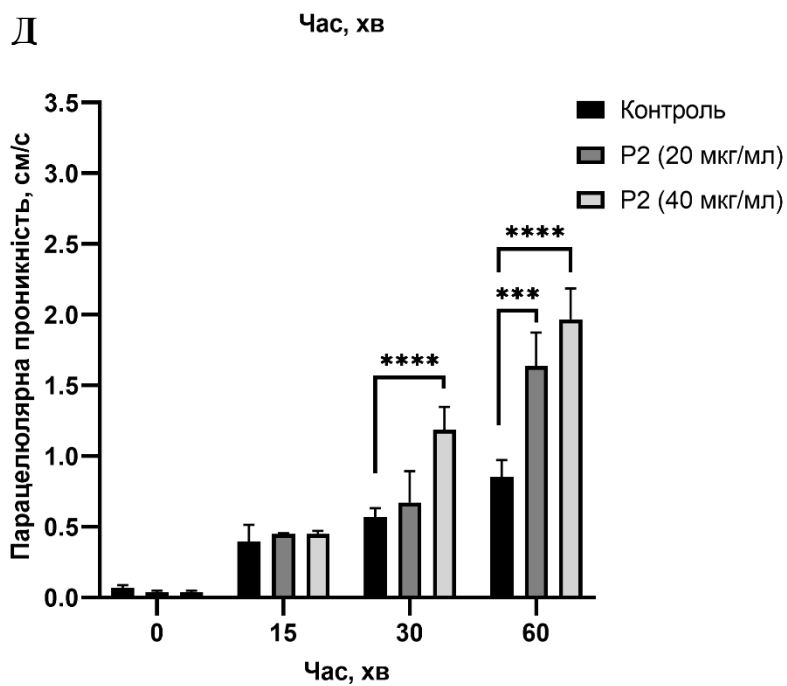
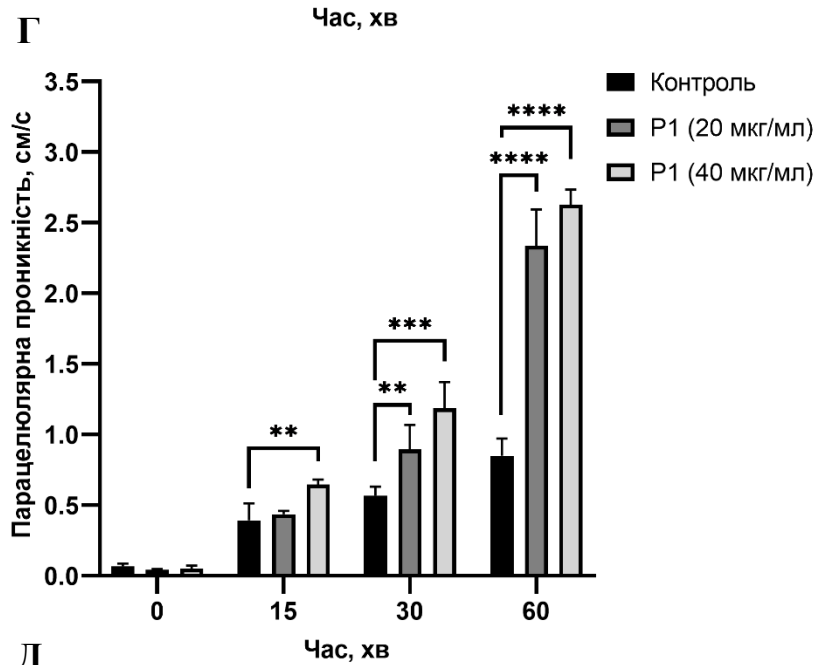
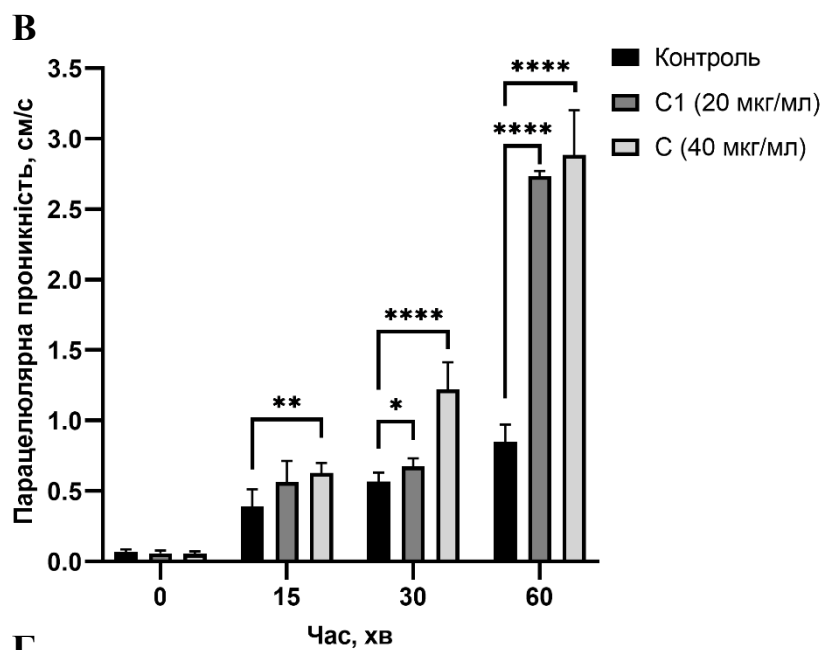
3.1.2 Дослідження впливу препаратів з РМ на парацелюлярну проникність кишкового бар'єру

Проникність кишкового бар'єру – це показник, за допомогою якого можна оцінювати цілісність мембрани. У експерименті із FITC-декстраном було визначено, що показники у контрольній групі зростали з часом (рис. 3.7). Так, початкове значення становило $0,07 \pm 0,02$ см/с, через 15 хвилин воно поступово збільшилось до $0,39 \pm 0,12$ см/с, ще за 15 хвилин було вже $0,57 \pm 0,06$ см/с і через 60 хвилин від моменту додавання FITC-декстрану становило $0,85 \pm 0,12$ см/с.

Найбільш незначні зміни у показниках мали групи, які отримували препарат із речовиною B2 у концентраціях 20 мкг/мл та 40 мкг/мл. Їх контрольні значення ($0,05 \pm 0,02$ см/с для обох концентрацій) за 60 хвилин збільшились на 0,94 см/с та 1,18 см/с відповідно. Для груп, які отримували препарат B1 у обох концентраціях даний показник змінювався трохи радикальніше: до $1,54 \pm 0,09$ для концентрації 20 мкг/мл і $1,78 \pm 0,13$ для концентрації 40 мкг/мл за 60 хв.

Проникність у групах, де досліджувалися препарати С1, Р1, Р2 та PES в обох концентраціях, сильно зростала як у порівнянні із контрольними значеннями кожної групи окремо (у 1,5-2 рази), так і у порівнянні з контролем (у 2-3,5 рази). Найбільші показники були отримані у груп, у яких досліджувався препарат С1. Для них проникність за 60 хвилин експерименту становила $2,73 \pm 0,04$ см/с і $2,89 \pm 0,32$ см/с для концентрацій 40 мкг/мл та 20 мкг/мл відповідно.





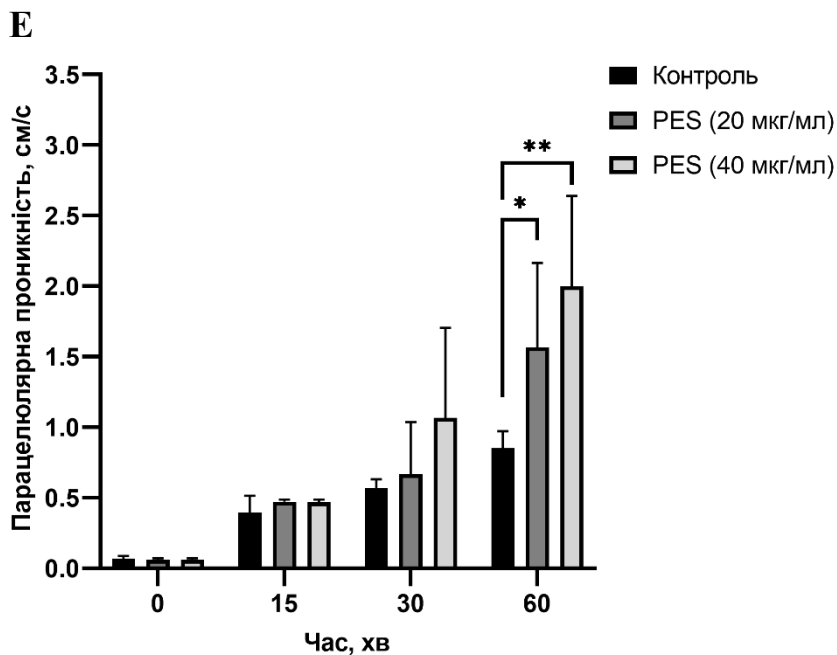


Рисунок 3.7 Зміна парацелюлярної проникності серо-мукозальних препаратів епітелію товстої кишки щурів для FITC-декстрану: (А) Порівняння груп, що отримували препарати з наночастинками диму, отриманого від згорання деревини берези (В1) у концентрації 20 та 40 мкг/мл, з контролем. (Б) Порівняння груп, що отримували препарати з наночастинками диму, отриманого від згорання кори берези (В2) у концентрації 20 та 40 мкг/мл, з контролем. (В) Порівняння груп, що отримували препарати з наночастинками диму, отриманого від згорання деревини тополі (С1) у концентрації 20 та 40 мкг/мл, з контролем. (Г) Порівняння груп, що отримували препарати з наночастинками диму, отриманого від згорання деревини сосни (Р1) у концентрації 20 та 40 мкг/мл, з контролем. (Д) Порівняння груп, що отримували препарати з наночастинками диму, отриманого від згорання гілля сосни (Р2) у концентрації 20 та 40 мкг/мл, з контролем. (Е) Порівняння груп, що отримували препарати з наночастинками диму, отриманого від згорання торфу (PES) у концентрації 20 та 40 мкг/мл, з контролем.

Отже, у результаті даного дослідження були отримані дані щодо ефекту карбонвмісних наночастинок диму на парацелюлярну проникність епітелію серо-мукозального препарату товстої кишки щурів. Бачимо що проникність епітелію поступово зростає з часом, маючи достовірні зміни за 30 хв дії препарату С1 в концентрації 40 мкг/мл, а для інших груп через 60 хв. До того ж, у більшості препаратів спостерігається дозозалежний ефект між 20 мкг/мл та 40 мкг/мл (табл. 3.2), що вказує на кореляцію зі збільшенням токсичності.

Таблиця 3.2

Рівень зміни парацелюлярної проникності серо-мукозального препарату товстої кишки щурів для FITC-декстрану через 60 хв після додавання карбонвмісних частинок диму у порівнянні з контрольними показниками

Препарат диму	Різниця середніх значень експериментального та контрольного показників	
	20 мкг/мл	40 мкг/мл
B1	0,69	0,93
B2	0,14	0,38
C1	1,88	2,03
P1	1,49	1,78
P2	0,71	1,12
PES	0,79	1,15

Досліджувані препарати в результаті експериментів з дослідження парацелюлярної проникності товстої кишки щурів можна розташувати по шкалі від найменш до найбільш токсичних $B2 < B1 < P2 < PES < P1 < C1$, що свідчить про порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єру.

3.2. Вплив препарату з наночастинками-забруднювачами повітря природнього походження на бар'єрну функцію товстої кишки в залежності від шляху його введення

Наступним завданням було порівняти вплив синтезованого препарату РМ диму природнього походження на розвиток запального процесу за різних шляхів введення. Оскільки препарат, отриманий від згоряння деревини тополі (С1), був визначений як найбільш токсичний, саме його було використано у наступних експериментах.

3.2.1. Вплив препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі (С1) на проникність ендотелію товстої кишки

Пацієнти, що мають хронічні захворювання, включно із запальними захворюваннями кишечника, часто мають порушення функціонального стану ендотелію судин, тому цей показник є одним з маркерів розвитку запалення [88]. Щоб підтвердити порушення його бар'єрної функції, була визначена проникність ендотелію за кількістю фарби Еванса у слизовій оболонці товстої кишки.

При порівнянні кількості ЕВ у контрольної групи та груп, яким вводили С1 і внутрішньовенно, і перорально, через 3 години не було виявлено відмінностей (рис. 3.8).

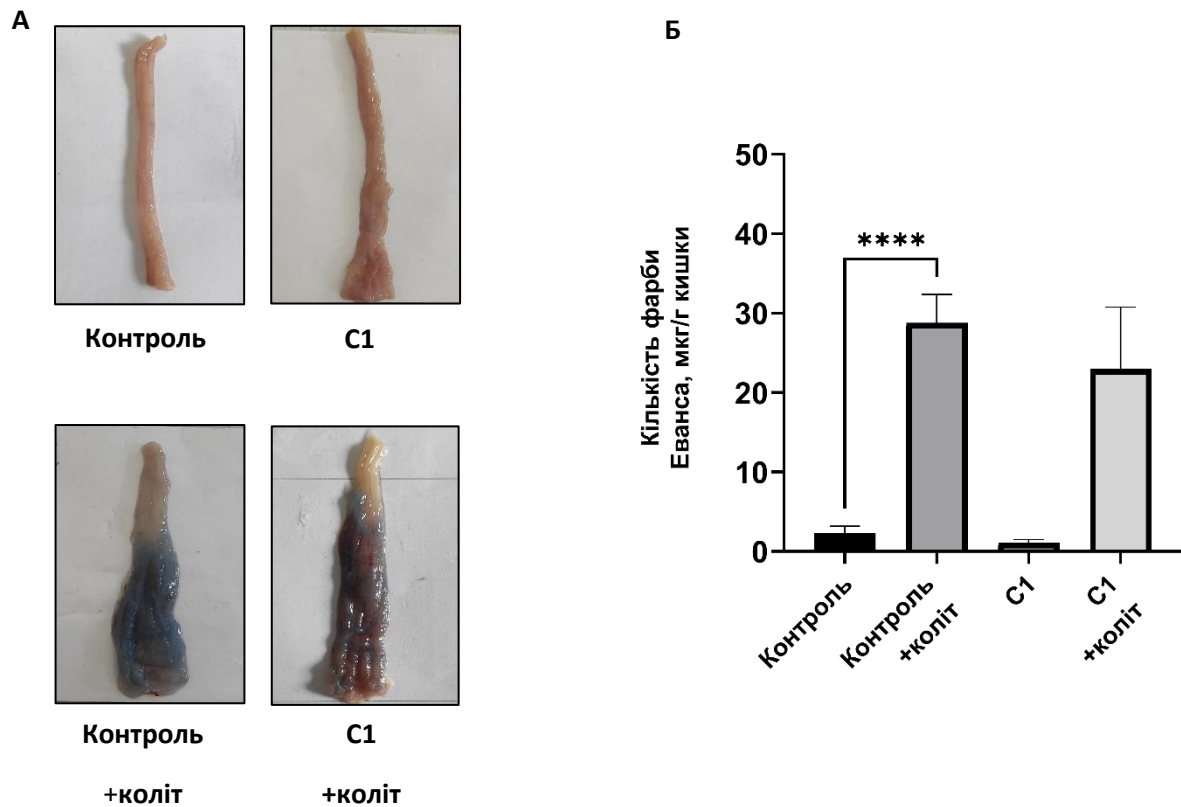


Рис.3.8. Концентрація фарби Еванса у слизовій оболонці товстої кишки експериментальної групи щурів без ($n = 6$) та з модельованим колітом ($n = 8$) через 3 години після внутрішньовенного введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі (С1) (500 мкг/100 г маси тіла тварини): А – репрезентативні знімки товстої кишки; Б – кількісні показники проникності ендотелію. Контроль без коліту ($n = 6$), контроль з модельованим колітом ($n = 8$). $M \pm SD$.

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

Модельований коліт суттєво підвищує проникність ендотелію експериментальних тварин. Було показано, що у групі негативного контролю з експериментальним колітом кількість ЕВ становила $29 \pm 3,6$ мкг/г кишки, що у десять раз більше ніж у групі позитивного контролю без коліту. Проте група щурів з колітом, яким вводили препарат диму внутрішньовенно, не мала значних відмінностей від негативного контролю. При цьому у групі тварин з колітом, яка отримувала препарат перорально, проникність навпаки знижувалась (рис. 3.9). Маючи такі результати можна припустити, що

препарат РМ диму, отриманий від згоряння деревини тополі, можливо, має абсорбуючу дію, що не дало можливості розвинути коліту до контрольних значень.

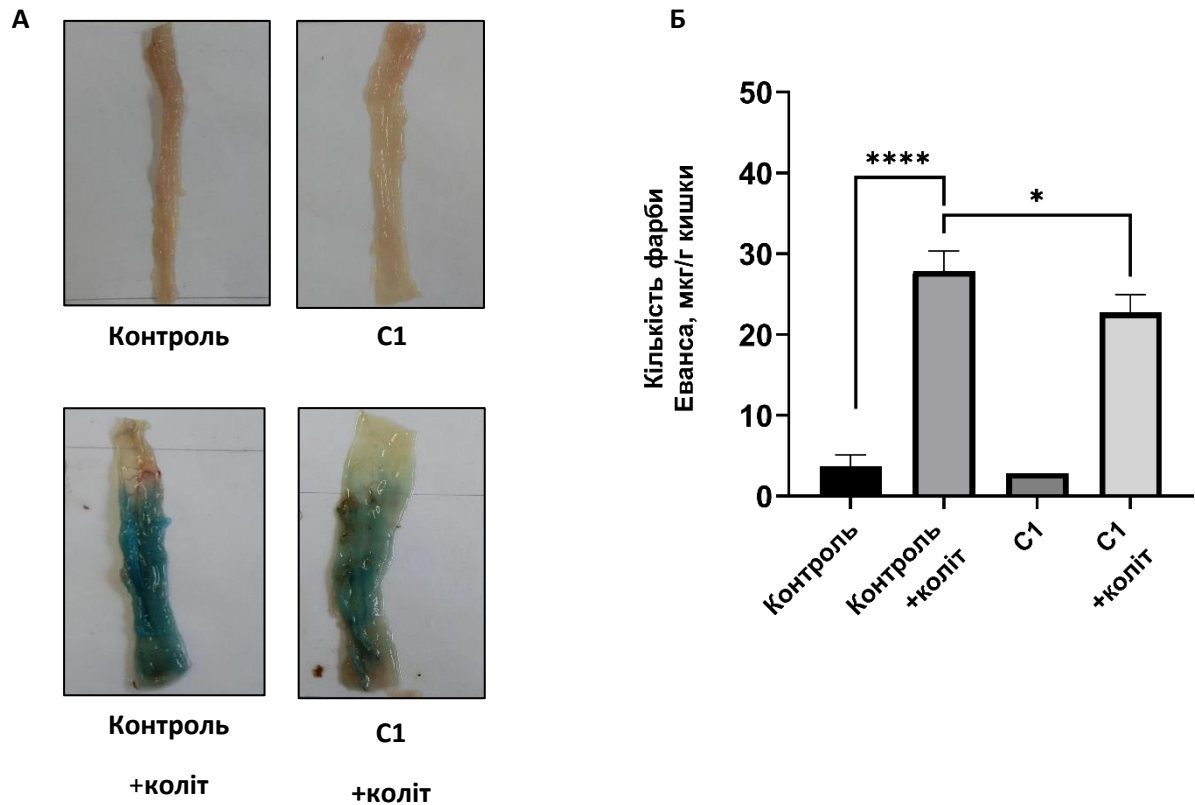


Рис.3.9. Концентрація фарби Еванса у слизовій оболонці товстої кишки експериментальної групи щурів без ($n = 5$) та з модельованим колітом ($n = 5$) через 3 години після перорального введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі (C1) (180 мкг/100 г маси тіла тварини): А – репрезентативні знімки товстої кишки; Б – кількісні показники проникності ендотелію. Контроль без коліту ($n = 5$), контроль з модельованим колітом ($n = 5$). $M \pm SD$.

Про порушення цілісності ендотелію також свідчить поява крові у сечі, яка була виявлена у 57,14% щурів через годину після внутрішньовенного введення препарату ($n = 14$). Ні у контрольній групі, ні у групі яким вводили препарат перорально такого симптому не було. Через це можна припустити,

що внутрішньовенне введення препарату пошкоджує фенестровані капіляри клубочки нефронів.

3.2.2. Зміна кількості поверхневого слизу товстої кишки щурів після введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі

Для групи внутрішньовенного введення за допомогою Шиф-реакції було підтверджено відмінність у кількості глікопротеїнів у позитивного та негативного контролів (рис.3.3). А для групи яка отримувала препарат С1 було виявлено зниження відносного вмісту глікопротеїнів у 2 рази порівняно з групою тварин позитивного контролю без коліту (* - $p < 0,05$). Але у групі з експериментальним колітом при введенні досліджуваного препарату С1 негативний ефект на кількість поверхневого слизу в товстій кишці не підсилювався (рис.3.10 А).

При пероральному введенні спостерігався схожий вплив на кількість поверхневого слизу товстої кишки (рис.3.10 Б). Відносний вміст глікопротеїнів у складі поверхневого слизу товстої кишки групи щурів, що отримувала досліджувану речовину, був нижчим від контрольних значень у 1,86 разів.

Таку ж різниця було виявлено також при порівнянні групи з модельованим колітом, що отримувала препарат, із контролем. Отже, при пероральному введенні препарату С1 кількість слизу знижувалась в обох випадках, незалежно від того чи моделювався коліт.

Від зміни вуглеводного складу поверхневого слизу кишечника цілком залежать якість і кількість слизу, які у свою чергу відіграють ключову роль у забезпеченні бар'єрної функції кишечника. Результати цих експериментів свідчать про порушення цієї функції при обох способах введення С1.

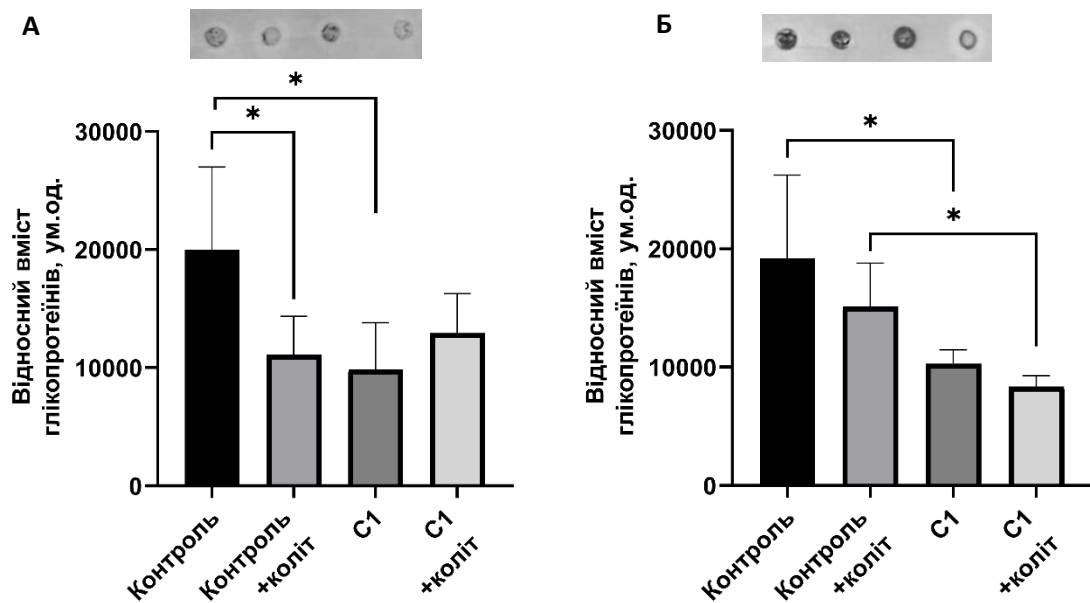


Рис.3.10. Рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів через 3 години після введення препарату РМ диму природного походження: А – внутрішньовенне введення (500 мкг/100 г маси тіла тварини), експериментальна групи щурів без (n = 6) та з модельованим колітом (n = 8), контроль без коліту (n = 6), контроль з модельованим колітом (n = 8); Б – пероральне введення (180 мкг/100 г маси тіла тварини), експериментальної групи щурів без (n = 5) та з модельованим колітом (n = 5), контроль без коліту (n = 5), контроль з модельованим колітом (n = 5). M±SD.

* - p<0,05

3.2.3. Визначення транслокації бактерій в кров

У результаті порушення проникності епітелію товстої кишки можлива транслокація бактерій з просвіту у системний кровотік. У зв'язку з цим була досліджена загальна кількість мікроорганізмів (lgКУО) у пробі крові з ворітної вени щурів після перорального введення препарату. Було показано, що за 3

години після введення препарату кількість мікроорганізмів в крові щурів статистично вірогідно відрізнялась (рис. 3.11).

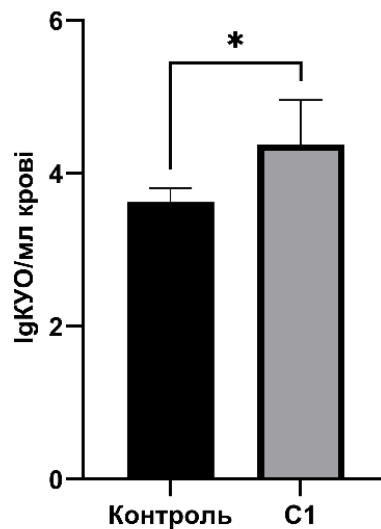


Рис.3.11. Загальна кількість мікроорганізмів (IgKYO/мл) у крові портальної вени експериментальної групи щурів (n = 10) через 3 години після перорального введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі (C1) (180 мкг/100 г маси тіла тварини), контроль (n = 10). M±SD.

* - $p < 0,05$

У результаті можна зробити висновок, що введення препарату РМ диму природнього походження, отриманого від згоряння деревини тополі (C1), призводить до збільшення проникності епітелію товстої кишки та транслокації бактерій у кров вже через 3 години після його введення.

3.2.4. Визначення активності мієлопероксидази у товстій кишці щурів у залежності від способу введення препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі

Дослідження змін показнику активності МПО у товстій кишці щурів після введення препарату показало, що він мав тенденцію до зростання при обох

шляхах введення (рис.3.12). Після внутрішньовенного введення показник зростав на 11 од/г кишки, а після перорального – на 18 од/г кишки, проте в обох випадках ці зміни не були достовірними.

А між негативним та позитивним контролями було встановлено достовірну відмінність. Також було помічено, що як при внутрішньовенному, так і при пероральному введенні у груп з модельованим колітом активність МПО незначно знижувалась. Можна припустити, що така реакція пов'язана із взаємодією препарату з активними формами кисню за умови різкого зростання вироблення останніх у товстій кишці.

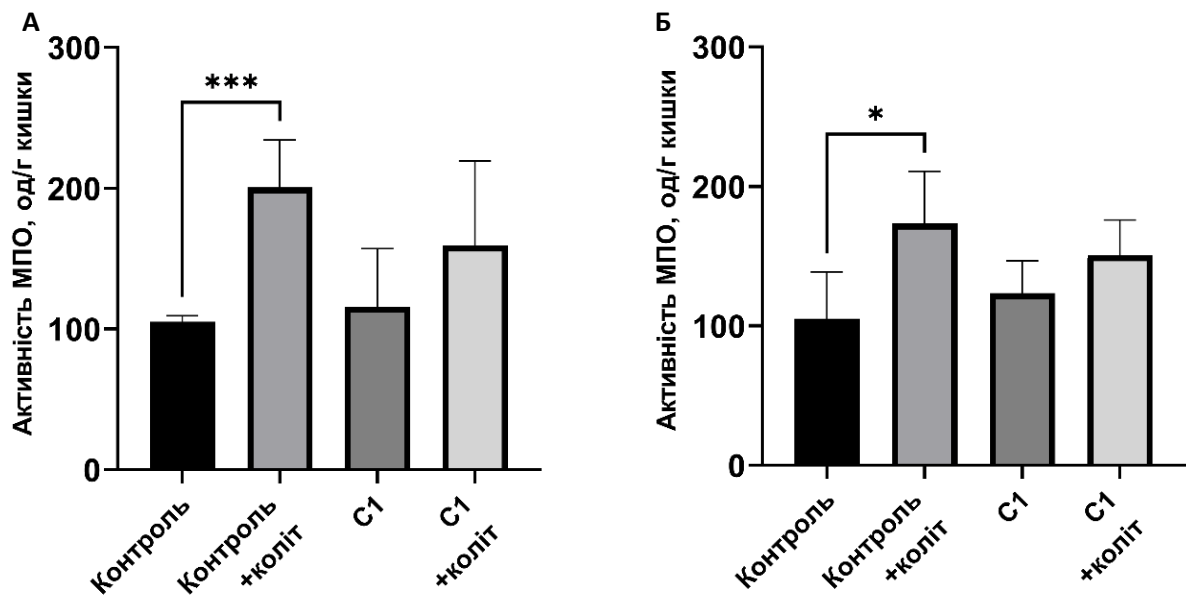


Рис.3.12. Зміна активності мієлопероксидази (МПО) у товстій кишці щурів через 3 години після введення препарату РМ диму природного походження: А – внутрішньовенне введення (500 мкг/100 г маси тіла тварини), експериментальна групи щурів без (n = 6) та з модельованим колітом (n = 8), контроль без коліту (n = 6), контроль з модельованим колітом (n = 8); Б – пероральне введення (180 мкг/100 г маси тіла тварини), експериментальної групи щурів без (n = 5) та з модельованим колітом (n = 5), контроль без коліту (n = 5), контроль з модельованим колітом (n = 5). M±SD.
* - p<0,05

*** - p<0,001

Таким чином, короткочасна дія наночастинок диму, отриманого від згоряння деревини тополі (С1), достовірно не мала відмінностей у впливі на запальні процеси товстої кишки щурів ані за внутрішньовенного, ані за перорального введення препарату, але спостережувані тренди в змінах різних показників говорять про погіршення загального стану. Крім того варто зауважити, що пероральне введення мало негативніший вплив на перебіг йодоацетамід-викликаного експериментального коліту у щурів у порівнянні з внутрішньовенним шляхом введення.

ВИСНОВКИ

1. Проведений аналіз літературних джерел підтвердив гіпотезу, що тверді наночастинки-забруднювачі повітря можуть впливати на стан кишкового бар'єру та бути пов'язаними із запальними захворюваннями кишечника.

2. Визначили, що тверді частинки диму природного походження за впливом на потік йонів поділяються на 3 типи: 1) зменшують значення струму короткого замикання, а отже зменшують іонну провідність тканини і асоціюються зі зменшенням електрогенного транспорту аніонів в концентрації 20 мкг/мл і зменшують цей ефект зі збільшенням концентрації до 40 мкг/мл (до цих препаратів належать $P1 < B1 < B2$); 2) дозозалежно зменшують провідність серомукозального препарату, що асоціюється зі зменшенням електрогенного транспорту аніонів ($P2 < C1$); 3) справляють дозозажений різнонаправлений ефект, зменшуючи провідність серомукозального препарату і одночасно незначно збільшуючі електрогенний транспорт аніонів (PES).

3. Було виявлено поступове у часі збільшення парацелюлярної проникності (маркер FITC-декстран, 4 кДа) серомукозального препарату товстої кишки щурів за дії карбонвмісних наночастинок диму у відповідній послідовності: $B2 < B1 < P2 < PES < P1 < C1$. До того ж у переважна більшість препаратів мала дозозалежний ефект між 20 мкг/мл та 40 мкг/мл, який корелював зі збільшенням токсичності.

4. Короткотривала (3 години) дія препарату РМ диму, отриманого від згоряння деревини тополі, не мала вірогідного впливу на проникність ендотелію судин слизової оболонки товстої кишки щурів або активність мієлопероксидази – маркеру інфільтрації лейкоцитів та їх активації, але зменшувала кількість поверхневого слизу у товстій кишці. Пероральне введення препарату збільшувало транслокацію бактерій у ворітну вену щурів. Через годину після внутрішньовенного введення у сечі виявляли кров, що

може бути наслідком пошкодження фенестрованих капілярів клубочків нефронів.

5. Введення препарату РМ диму (3 години), отриманого від згорання деревини тополі, внутрішньовенно не поглиблювало негативний ефект йодоацетамід-викликаного коліту у щурів на зміни у стані ендотеліального бар'єру, активності мієлопероксидази та кількості поверхневого слизу в товстій кишці.

6. Введення препарату РМ диму (3 години), отриманого від згорання деревини тополі, перорально незначно зменшувало негативний ефект йодоацетамід-викликаного коліту у щурів на зміни у стані ендотеліального бар'єру, що не відобразилося на рівні активності мієлопероксидази. Проте пероральне введення препарату вірогідно зменшувало кількість поверхневого слизу в товстій кишці відносно групи з колітом, яка отримувала плацебо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ambient (outdoor) air pollution. (2018). World Health Organisation. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).
2. S. W. H. Assembly, “Health and the environment : addressing the health impact of air pollution,” vol. 1, no. May, pp. 1–7, 2015.
3. L. A. Beamish, A. R. Osornio-vargas, and E. Wine, “Air pollution : An environmental factor contributing to intestinal disease,” *J. Crohn’s Colitis*, vol. 5, no. 4, pp. 279–286, 2011, doi: 10.1016/j.crohns.2011.02.017.
4. E. A. Mutlu *et al.*, “Inhalational exposure to particulate matter air pollution alters the composition of the gut microbiome,” vol. 240, 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.130.
5. D. Leddin *et al.*, “Uniting the Global Gastroenterology Community to Meet the Challenge of Climate Change and Nonrecyclable Waste.,” *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 55, no. 10, pp. 823–829, 2021, doi: 10.1097/MCG.0000000000001619.
6. R. B. Hamanaka and G. M. Mutlu, “Particulate Matter Air Pollution : Effects on the Cardiovascular System,” vol. 9, no. November, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00680.
7. B. M. Kuehn, “WHO: More Than 7 Million Air Pollution Deaths Each Year,” p. 2014, 2014.
8. D. J. Gubler *et al.*, “Climate Variability and Change in the United States : Potential Impacts on Vector- and Rodent-Borne Diseases,” 2014.
9. D. E. Newby *et al.*, “Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease,” pp. 83–93, 2015, doi: 10.1093/eurheartj/ehu458.
10. R. D. Brook *et al.*, “Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease An Update to the Scientific Statement From the American,” 2010, doi: 10.1161/CIR.0b013e3181dbee1.
11. M. T. Chin, “Basic mechanisms for adverse cardiovascular events

associated with air pollution,” pp. 1–4, 2014, doi: 10.1136/heartjnl-2014-306379.

12. R. D. Brook *et al.*, “Air Pollution and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association,” pp. 2655–2671, 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8.

13. U. Pöschl, “Atmospheric aerosols: Composition, transformation, climate and health effects,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 46, pp. 7520–7540, 2005, doi: 10.1002/anie.200501122.

14. R. Guaita, M. Pichiule, and T. Maté, “International Journal of Environmental Short-term impact of particulate matter (PM 2 . 5) on respiratory mortality in Madrid,” no. December 2014, pp. 37–41, 2011, doi: 10.1080/09603123.2010.544033.

15. C. A. Pope III, “Epidemiology of Fine Particulate Air Pollution and Human Health : Biologic Mechanisms and Who ’ s at Risk ?,” no. August, 1999.

16. M. R. Miller, C. A. Shaw, and J. P. Langrish, “From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution,” vol. 8, pp. 577–602, 2012.

17. S. Hasheminassab, N. Daher, J. J. Schauer, and C. Sioutas, “Source apportionment and organic compound characterization of ambient ultra fi ne particulate matter (PM) in the Los Angeles Basin,” *Atmos. Environ.*, vol. 79, pp. 529–539, 2013, doi: 10.1016/j.atmosenv.2013.07.040.

18. C. Johansson and M. Norman, “Spatial & temporal variations of PM10 and particle number concentrations in urban air,” pp. 477–487, 2007, doi: 10.1007/s10661-006-9296-4.

19. R. W. Atkinson, G. W. Fuller, H. R. Anderson, R. M. Harrison, and B. Armstrong, “Urban Ambient Particle Metrics and Health,” vol. 21, no. 4, 2010, doi: 10.1097/EDE.0b013e3181debc88.

20. B. Srimuruganandam and S. M. S. Nagendra, “Science of the Total Environment Source characterization of PM 10 and PM 2 . 5 mass using a chemical mass balance model at urban roadside,” *Sci. Total Environ.*, vol. 433, pp. 8–19, 2012,

doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.05.082.

21. C. Misra, M. D. Geller, P. Shah, C. Sioutas, A. Paul, and P. A. Solomon, "Development and Evaluation of a Continuous Coarse (PM 10 – PM 25) Particle Monitor Development and Evaluation of a Continuous Coarse," no. October 2014, pp. 37–41, doi: 10.1080/10473289.2001.10464360.

22. J. Madureira, I. Paciência, and E. D. O. Fernandes, "Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A : Current Issues Levels and Indoor – Outdoor Relationships of Size- Specific Particulate Matter in Naturally Ventilated Portuguese Schools," no. October 2014, pp. 37–41, 2012, doi: 10.1080/15287394.2012.721177.

23. C. Chen, P. Chen, and C. Yang, "Relationship between fine particulate air pollution exposure and human adult life expectancy in Taiwan," *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*, vol. 0, no. 0, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1080/15287394.2019.1658386.

24. R. Burnett *et al.*, "Global estimates of mortality associated with long- term exposure to outdoor fine particulate matter," no. 1, pp. 1–6, 2018, doi: 10.1073/pnas.1803222115.

25. A. N. Balakrishnan, K., Dey, S., Gupta, T., Dhaliwal, R. S., Brauer, M., Cohen, A. J., Aggarwal, "The impact of air pollution on deaths , disease burden , and life expectancy across the states of India : the Global Burden of Disease Study 2017," pp. 26–39, 2019, doi: 10.1016/S2542-5196(18)30261-4.

26. P. J. Landrigan *et al.*, "The Lancet Commission on pollution and health," vol. 6736, no. 17, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)32345-0.

27. C. Pinichka, N. Makka, D. Sukkumnoed, S. Chariyalertsak, P. Inchai, and K. Bundhamcharoen, "Burden of disease attributed to ambient air pollution in Thailand : A GIS-based approach," no. 2, pp. 1–18, 2017.

28. S. Tsai and C. Chen, "Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A : Current Issues Short-Term Effect of Fine Particulate Air Pollution on Daily Mortality : A Case-Crossover Study in a Tropical City , Kaohsiung , Taiwan," no. March 2015, pp. 37–41, 2014, doi: 10.1080/15287394.2014.881247.

29. J. Lelieveld, K. Klingmu, A. Pozzer, U. Po, A. Daiber, and T. Mu, "Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed

- using novel hazard ratio functions,” pp. 1–7, 2019, doi: 10.1093/eurheartj/ehz135.
30. C. A. P. Iii, R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, and G. D. Thurston, “Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution,” vol. 287, no. 9, 2002.
31. A. Vodonos, Y. A. Awad, and J. Schwartz, “The concentration-response between long-term PM_{2.5} exposure and mortality ; A meta-regression approach,” *Environ. Res.*, vol. 166, no. December 2017, pp. 677–689, 2018, doi: 10.1016/j.envres.2018.06.021.
32. S. D. Adar, P. A. Filigrana, N. Clements, and J. L. Peel, “Ambient Coarse Particulate Matter and Human Health : A Systematic Review and Meta-Analysis,” pp. 258–274, 2014, doi: 10.1007/s40572-014-0022-z.
33. D. Loomis *et al.*, “The carcinogenicity of outdoor air pollution,” *Lancet Oncol.*, vol. 2045, no. 13, pp. 1–2, 2013, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70487-X.
34. L. Benbrahim-tallaa *et al.*, “Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes,” *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 7, pp. 663–664, 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70280-2.
35. T. Bourdrel, M. Bind, Y. Béjot, and O. Morel, “Cardiovascular effects of air pollution,” 2019, doi: 10.1016/j.acvd.2017.05.003.
36. E. Suades-González, M. Gascon, and J. Sunyer, “Air Pollution and Neuropsychological Development: A Review of the Latest Evidence,” vol. 156, no. October, pp. 3473–3482, 2015, doi: 10.1210/en.2015-1403.
37. D. E. Schraufnagel *et al.*, “Air Pollution and Noncommunicable Diseases A Review by the Forum of International Respiratory Societies ’ Environmental Committee . Part 2 : Air Pollution and Organ Systems,” *Chest*, no. December, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.chest.2018.10.041.
38. P. D. P. Bert, E. Mae, H. Mercader, J. Pujol, J. Sunyer, and M. Mortamais, “The Effects of Air Pollution on the Brain : a Review of Studies Interfacing Environmental Epidemiology and Neuroimaging,” pp. 351–364, 2018.
39. S. Genc, Z. Zadeoglulari, S. H. Fuss, and K. Genc, “The Adverse Effects of Air Pollution on the Nervous System,” vol. 2012, 2012, doi:

10.1155/2012/782462.

40. M. L. Block and L. Calderon-Garciduenas, "Air pollution : mechanisms of neuroinflammation and CNS disease," 2009, doi: 10.1016/j.tins.2009.05.009.

41. A. Gonzalez-Maciel, R. Reynoso-Robles, R. Torres-Jardon, P. S. Mukherjee, and L. Calderon-Garciduenas, "Combustion-Derived Nanoparticles in Key Brain Target Cells and Organelles in Young Urbanites: Culprit Hidden in Plain Sight in Alzheimer's Disease Development," 2017, doi: 10.3233/JAD-170012.

42. A. Campbell *et al.*, "Particulate Matter in Polluted Air May Increase Biomarkers of Inflammation in Mouse Brain," vol. 26, pp. 133–140, 2005, doi: 10.1016/j.neuro.2004.08.003.

43. M. Brauer, C. Avila-casado, T. I. Fortoul, S. Vedal, B. Stevens, and A. Churg, "Air Pollution and Retained Particles in the Lung," vol. 109, no. 10, pp. 1039–1043, 2001.

44. W. G. Kreyling *et al.*, "Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from extrapulmonary organs is size dependent but very," no. April 2013, pp. 1513–1530, 2011.

45. H. A. Nemmar, P.H.M. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M.F. Hoylaerts, L. Vanbilloen, Mortelmans, and B. Nemery, "Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans," pp. 411–414, 2002, doi: 10.1161/hc0402.104118.

46. H. Chen *et al.*, "Living near major roads and the incidence of dementia , Parkinson ' s disease , and multiple sclerosis : a population-based cohort study," vol. 6736, no. 16, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32399-6.

47. Y. Wu *et al.*, "Association between air pollutants and dementia risk in the elderly," *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.*, vol. 1, no. 2, pp. 220–228, 2015, doi: 10.1016/j.dadm.2014.11.015.

48. M. F. Uchoa, V. A. Moser, and C. J. Pike, "Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors," *Front. Neuroendocrinol.*, 2016, doi: 10.1016/j.yfrne.2016.09.001.

49. Міністерство охорони здоров'я України, "Уніфікований клінічний

протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги запальні захворювання кишечника (хвороба крона, виразковий коліт)", 2016.

50. D. T. Rubin *et al.*, "ACG Clinical Guideline : Ulcerative Colitis in Adults," vol. 114, no. March, pp. 384–413, 2019.

51. S. Meyers and H. Janowitz, "The 'Natural History' of Ulcerative Colitis: An Analysis of the Placebo Response."

52. M. Fumery, S. Singh, P. S. Dulai, and C. Gower-rousseau, "Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, p. 44, 2017, doi: 10.1016/j.cgh.2017.06.016.

53. C. N. Bernstein *et al.*, "A Review of Mortality and Surgery in Ulcerative Colitis Milestones of the Seriousness of the Disease REVIEW ARTICLE A Review of Mortality and Surgery in Ulcerative Colitis : Milestones of the Seriousness of the Disease," no. May, 2018, doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f3bb.

54. T. Jess, M. Frisch, and J. Simonsen, "Trends in Overall and Cause-Specific Mortality Among Patients With Inflammatory Bowel Disease From 1982 to 2010," *YJCGH*, vol. 11, no. 1, pp. 43–48, 2013, doi: 10.1016/j.cgh.2012.09.026.

55. M. Regueiro, J. B. Greer, and E. Szigethy, "Etiology and Treatment of Pain and Psychosocial Issues in Patients with Inflammatory Bowel Diseases," *Gastroenterology*, 2016, doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.036.

56. L. J. Herrinton, L. Liu, T. R. Levin, J. E. Allison, J. D. Lewis, and F. Velayos, "Incidence and Mortality of Colorectal Adenocarcinoma in Persons With Inflammatory Bowel Disease From 1998 to 2010 See Covering the Cover synopsis on page 276 ;," *YGAST*, vol. 143, no. 2, pp. 382–389, 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.054.

57. M. Rutter *et al.*, "Neoplasia in Ulcerative Colitis," pp. 451–459, 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2003.11.010.

[58] E. P. R. Royer, R. D. Cohen, S. B. Hanauer, J. Hart, and J. R. Turner, "Inflammation Is an Independent Risk Factor for Colonic Neoplasia in Patients With Ulcerative Colitis: A Case–Control Study," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 11,

no. 12, pp. 1601-1608.e4, 2013, doi: 10.1016/j.cgh.2013.06.023.

59. R. J. Colman and D. T. Rubin, “Histological inflammation increases the risk of colorectal neoplasia in ulcerative colitis : a systematic review,” vol. 14, no. 3, pp. 202–210, 2016.

60. T. Wilkins *et al.*, “Diagnosis and Management of Crohn’s Disease,” pp. 1365–1375, 2011.

61. M. D. Kappelman, K. R. Moore, J. K. Allen, and S. F. Cook, “Recent Trends in the Prevalence of Crohn ’ s Disease and Ulcerative Colitis in a Commercially Insured US Population,” pp. 519–525, 2013, doi: 10.1007/s10620-012-2371-5.

62. Y. R. Wang, V. L. Jr, R. Cangemi, and M. F. Picco, “Racial / Ethnic and Regional Differences in the Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the United States,” vol. 08054, pp. 20–25, 2013, doi: 10.1159/000350759.

63. A. N. Ananthakrishnan, “Epidemiology and risk factors for IBD,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 12, no. 4, pp. 205–217, 2015, doi: 10.1038/nrgastro.2015.34.

64. I. S. Soon, N. A. Molodecky, D. M. Rabi, W. A. Ghali, and H. W. Barkema, “The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases : a systematic review and meta-analysis,” 2012.

65. G. R. Lichtenstein *et al.*, “ACG Clinical Guideline : Management of Crohn ’ s Disease in Adults,” no. June 2017, pp. 1–37, 2018, doi: 10.1038/ajg.2018.27.

66. ICRP, “Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection.”

67. W. G. Kreyling *et al.*, “Anatomic localization of 24- and 96-h particle retention in canine airways,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 87, no. 1, pp. 269–284, 1999, doi: 10.1152/jappl.1999.87.1.269.

68. W. Moller *et al.*, “Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects,” pp. 2200–2206, 2004, doi: 10.1152/jappphysiol.00970.2003.

69. X. M. Bustamante-Marin and L. E. Ostrowski, “Cilia and mucociliary clearance,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 466–470, 2006, doi:

10.1101/cshperspect.a028241.

70. G. C. S. Thomas G. O’riodan, “Murray & Nadel’s Textbook of Respiratory Medicine 2-Volume Set 7th edition, Chapter 13 Aerosols and Drug Delivery.” 2022.

71. M. Semmler-Behnke et al., “Efficient elimination of inhaled nanoparticles from the alveolar region: Evidence for interstitial uptake and subsequent reentrainment onto airways epithelium,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 115, no. 5, pp. 728–733, 2007, doi: 10.1289/ehp.9685.

72. E. A. Mutlu *et al.*, “Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice,” pp. 1–13, 2011, doi: 10.1186/1743-8977-8-19.

73. G. G. Kaplan et al., “Effect of ambient air pollution on the incidence of appendicitis,” *Cmaj*, vol. 181, no. 9, pp. 591–597, 2009, doi: 10.1503/cmaj.082068.

74. G. López-Abente, J. García-Pérez, P. Fernández-Navarro, E. Boldo, and R. Ramis, “Colorectal cancer mortality and industrial pollution in Spain,” *BMC Public Health*, vol. 12, no. 1, 2012, doi: 10.1186/1471-2458-12-589.

75. A. N. Ananthakrishnan, E. L. McGinley, D. G. Binion, and K. Saeian, “Ambient air pollution correlates with hospitalizations for inflammatory bowel disease: An ecologic analysis,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 17, no. 5, pp. 1138–1145, 2011, doi: 10.1002/ibd.21455.

76. M. C. Arrieta, L. Bistritz, and J. B. Meddings, “Alterations in intestinal permeability,” *Gut*, vol. 55, no. 10, pp. 1512–1520, 2006, doi: 10.1136/gut.2005.085373.

77. L. Kish et al., “Environmental Particulate Matter Induces Murine Intestinal Inflammatory Responses and Alters the Gut Microbiome,” vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0062220.

78. D. R. Brown and S. M. O. Grady, “The Ussing Chamber and Measurement of Drug Actions on Mucosal Ion Transport,” no. May 2008, pp. 1–17, doi: 10.1002/0471141755.ph0712s41.

79. L. L. Clarke, “A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine,” pp. 1151–1166, 2009, doi: 10.1152/ajpgi.90649.2008.

80. Терещенко, М. Ф., Тимчик, Г. С., Яковенко, І. О. (2019). Біофізика. Практикум. Вид-во «Політехніка», с. 140.
81. M. Larauche et al., “Cortagine , a CRF 1 agonist , induces stresslike alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways,” 2009, doi: 10.1152/ajpgi.00072.2009.
82. H. Satoh, F. Sato, K. Takami, and S. Szabo, “New Ulcerative and Colitis Model Induced by Sulfhydryl Drugs Blockers on the Colitis in Rats the Effects of Antiinflammatory”.
83. M. A. McGuckin, S. K. Lindén, P. Sutton, and T. H. Florin, “FOCUS ON MUCOSAL MICROB Mucin dynamics and enteric pathogens,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 9, no. 4, pp. 265–278, 2011, doi: 10.1038/nrmicro2538.
84. Y. Akiba et al., “Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum,” pp. 437–447, 2018.
85. T. Gramlich and R. E. Petras, “Pathology of inflammatory bowel disease,” pp. 154–163, 2007, doi: 10.1053/j.sempedsurg.2007.04.005.
86. B. Chami, N. J. J. Martin, J. M. Dennis, and P. K. Witting, “Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease,” *Arch. Biochem. Biophys.*, 2018, doi: 10.1016/j.abb.2018.03.012.
87. S. G. Schullz, Some properties and consequences of low–resistance paracellular pathway across the small intestine: the advantage of being “leaky”. In; Intestinal permeation. Kramer M., Lauterbach F., eds. Amsterdam. Excerpta medica,. 1977.
88. W. E. Cromer, J. M. Mathis, D. N. Granger, G. V Chaitanya, and J. S. Alexander, “Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases,” vol. 17, no. 5, pp. 578–593, 2011, doi: 10.3748/wjg.v17.i5.578.