

К. А. Бурлака, С. В. Павлов

## **Опосередкована TLR4-рецепторами побічна дія нестероїдних протизапальних лікарських засобів за тривалого застосування**

*Запорізький державний медико-фармацевтичний університет*

*Ключові слова: нестероїдні протизапальні лікарські засоби, TLR4-рецептори, шлунково-кишковий тракт, побічна дія*

В арсеналі сучасної медицини нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЛЗ) займають одну з лідируючих позицій за показаннями до застосування, терапевтичною ефективністю та відносною біобезпечністю. Разом з цим, окрім терапевтичних переваг НПЛЗ також можуть викликати небажані побічні ефекти, починаючи від ульцерогенної дії та закінчуючи онкогенезом, особливо за їхнього тривалого застосування. Останніми десятиріччями дослідження щодо молекулярних механізмів розвитку небажаних побічних ефектів НПЛЗ трансформувались від пригнічення секреції гастропротективних простагландинів до тонких молекулярних механізмів трансформації імунної відповіді, епігенетичних впливів і структурних змін у молекулярній будові функціонально активних молекул [1, 2].

У цьому аспекті певний науковий інтерес викликають молекулярні механізми побічної дії НПЛЗ, які пов'язані зі взаємодією та можливим впливом НПЛЗ на TLR (Toll-like receptor) [3, 4]. Вважається, що TLR відіграють значущу роль у механізмах розвитку небажаних побічних ефектів НПЛЗ. Відомо, що TLR є білковими молекулами, що модулюють імунну відповідь організму на різно-

манітні стимули, включаючи інфекції та запалення. Відомо, що в разі зв'язування TLR з відповідними лігандами відбувається активація низки адаптерних білків і кіназ, які беруть участь в індукції ключових прозапальних факторів, наслідком чого є експресія антиапоптотичних білків, цитокінів, антибактеріальних білків. Разом з тим, натепер встановлені принципово різні ефекти TLR на пухлини. З однієї сторони, TLR та їхні ліганди виступають у ролі супресорів пухлинного росту, з іншої, TLR можуть стимулювати пухлинну прогресію та впливати на стійкість пухлин до хіміотерапії. Натепер отримано переконливі дані щодо експресії TLR онкозміненими клітинами різноманітного походження та локалізації: колоректального раку, раку молочної залози, шлунка, легень, нейробластоми тощо [4–6]. Крім того почали з'являтися поодинокі дані щодо можливості TLR4-опосередкованої небажаної дії окремих НПЛЗ, що пов'язана з гіперстимуляцією TLR4 рецепторів і з подальшою активацією синтезу прозапальних цитокінів, гіперпродукції АФК та ініціювання онкогенезу, зокрема в шлунково-кишковому тракті. Дослідженнями останнього десятиріччя було встановлено, що вплив TLR на пухлину може бути як активуючим, так і інгібуючим. Так, активація TLR4 і TLR2 призводить до активного прогресування росту пухлини, у той самий час як активація TLR3, 5, 7, 9 у біль-

пості випадків призводила до зменшення прогресування росту пухлини [7–9]. Разом з цим, отримані експериментальні дані є досить суперечливими та несистематизованими, роль TL-рецепторів в онкогенезі та взаємозв'язок з НПЛЗ до кінця не встановлено, що зумовлює актуальність і перспективність подальших досліджень у цьому напрямі.

**Мета дослідження** – оцінка впливу тривалого введення індометацину, диклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на експресію TL4-рецепторів кишківника, маркери окисної деструкції білків (нітротирозин) та нуклеїнових кислот (8-гідрокси-2-дезоксигуанозин), маркер пошкодження кишківника (фекальний кальпротектин).

**Матеріали та методи.** У дослідженнях використано 50 щурів-самців лінії Wistar масою 250–400 г, яких отримано з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Усі експериментальні дослідження проводили з дотриманням основних положень Європейської конвенції про охорону хребетних тварин, що використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями (Страсбург, 1986 р.). Догляд, утримання та годування тварин здійснювали згідно з вимогами нормативних документів у стандартних умовах віварію. До початку проведення дослідження комісія з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету перевірила та погодила протокол дослідження (засідання комісії з біоетики ЗДМУ від 11.11.2019 № 7), а також усі процедури, що пов'язані з утриманням тварин, гуманним поводженням з тваринами й їхнім використанням в експерименті. Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх

тварин становила 14 днів. Протягом карантину проводили щоденний огляд кожної тварини (поведінку та загальний стан), двічі в день тварин спостерігали в клітинах (захворюваність і смертність) [10].

50 лабораторних щурів масою 250–400 г були розподілені на 5 експериментальних груп (по 10 тварин) наступним чином: 1 – контрольна, тваринам вводили щоденно впродовж 3 місяців розчин натрію хлориду 0,9 %, 2 – щури, яким вводили щоденно індометацин протягом 3 місяців у дозі 0,6 мг/кг, 3 – щури, яким вводили щоденно диклофенак протягом 3 місяців у дозі 0,6 мг/кг, 4 – щури, яким вводили щоденно ацетилсаліцилову кислоту протягом 3 місяців у дозі 0,6 мг/кг і 5 – щури, яким вводили щоденно мелоксикам протягом 3 місяців у дозі 0,1 мг/кг. Фізіологічний розчин і досліджувані препарати вводили внутрішньоочеревинно; дози НПЛЗ були обрані як середньотерапевтичні, виходячи з рекомендацій щодо безпечного тривалого застосування [11].

ELISA-методом досліджували наступні маркери: TL4-рецептори (Rat Toll-like Receptor 4, TLR4 ELISA Kit, Cat. No.: E0080Ra), 8-гідрокси-2-дезоксигуанозин, Rat 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosine, ELISA Kit, Catalogue No.: ER1487-HS), фекальний кальпротектин (ФК) (Faecal Calprotectin, Total, ELISA, Catalogue No.: EK-CAL2), нітротирозин (Ntz) (Nitrotyrosine, ELISA, Catalogue No.: HK501-02). Дослідження були проведені в гомогенаті кишківника (TLR-4, 8-OHdG, Ntz) та калі (фекальний кальпротектин) щурів відповідних експериментальних груп.

Тканини кишківника гомогенізувалися на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15 моль/л KCl) за температури + 4 °C, співвідношення

тканина-сольовий розчин – 1:40 [10]. Безбілковий екстракт одержували додаванням точної наважки гомогенізованої тканини у хлорну кислоту (0,6 моль/л) з подальшою нейтралізацією 5,0 моль/л калію карбонатом [11]. Кількісний аналіз відповідних маркерів здійснювали імуноферментним методом, що базується на використанні «сендвіч»-варіанту твердофазного імуноферментного аналізу зі застосуванням імуноферментного комплексу ImmunoChem-2100 (США) [12]. Аналіз проводили в 96-лункових мікропланшетах згідно з інструкцією виробників відповідних маркерів.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Для кожної досліджуваної величини визначали показники середнього арифметичного ( $M$ ) і стандартної помилки репрезентативності середнього арифметичного ( $m$ ). Нормальність розподілу оцінювали за критеріями Kolmogorov-Smirnov ( $D$ ) і Lilliefors, Shapiro-Wilk ( $W$ ). Результати досліджень аналізували методом параметричної кореляції з визначенням лінійного коефіцієнта кореляції

Пірсона ( $r$ ). При значенні  $r \leq 0,25$  кореляційний зв'язок вважали слабким, якщо  $0,25 < r < 0,75$  – помірним. При значенні  $r \geq 0,75$  такий взаємозв'язок розцінювали як сильний. Додатне значення коефіцієнта свідчить про пряму залежність між величинами (прямий, позитивний зв'язок), коли збільшення значення однієї ознаки збільшує значення іншої. Від'ємне значення коефіцієнта вказує на обернений (зворотний, негативний) зв'язок між досліджуваними показниками, коли зростання однієї ознаки призводить до зменшення іншої. Значимість коефіцієнта кореляції оцінювали за допомогою  $t$ -критерію Стьюдента при вірогідності похибки  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** На тлі довготривалого введення НПЛЗ експериментальним групам щурів змінювалась експресія TL4-рецепторів у тканинах кишківника. Значення всіх НПЛЗ достовірно перевищували показники контрольної групи тварин, а ацетилсаліцилова кислота, диклофенак та індометацин – відповідні показники мелоксикаму (таблиця).

Відомо, що на тлі застосування НПЛЗ відбувається блокада всіх ізо-

Таблиця

**Показники експресії TL4-рецепторів, концентрація 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину та нітротирозину в кишківнику експериментальних щурів за тривалого введення нестероїдних протизапальних лікарських засобів ( $M \pm m$ )**

Група тварин (n = 10)	TL4-рецептори, нг/мл	8-гідрокси-2-дезоксигуанозин, пг/мл	Нітротирозин, нмоль/л
Контрольна	0,45 ± 0,12	90,4 ± 5,7	10,4 ± 3,8
Мелоксикам, 0,1 мг/кг	0,69 ± 0,20*	100,7 ± 11,4	14,5 ± 3,7
Ацетилсаліцилова кислота, 0,6 мг/кг	1,3 ± 0,4**	200,4 ± 9,8**	211,3 ± 13,8**
Диклофенак, 0,6 мг/кг	2,3 ± 0,5**	361,8 ± 14,3**	504,5 ± 14,7**
Індометацин, 0,6 мг/кг	1,9 ± 0,3**	400,7 ± 15,6**	569,7 ± 12,5**

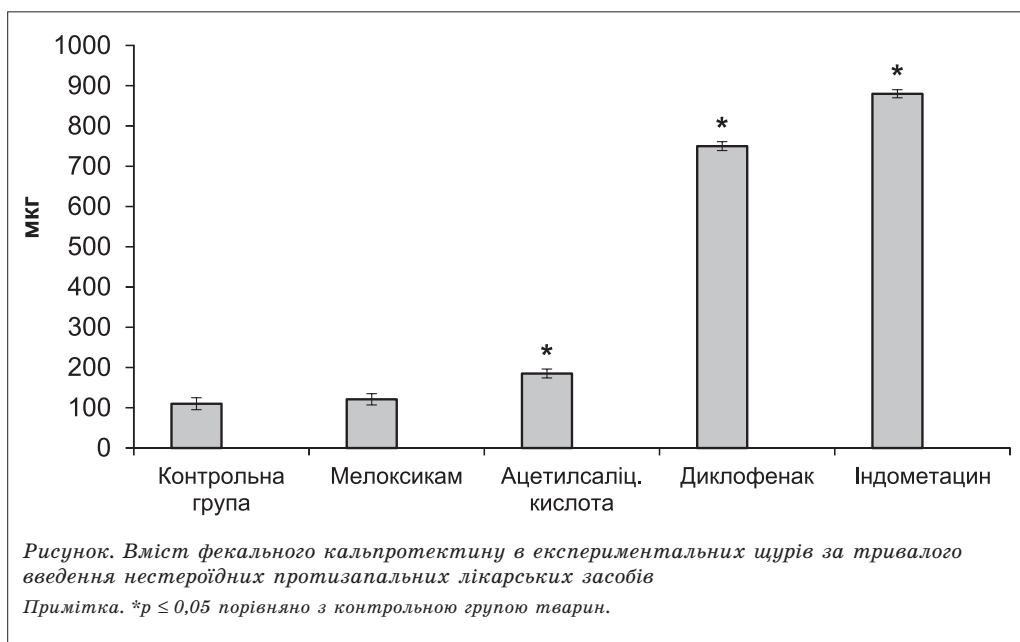
Примітка. \* $p \leq 0,05$  порівняно з контрольною групою тварин, \*\* $p \leq 0,05$  порівняно з групою тварин з тривалим застосуванням мелоксикаму.

форм циклооксигенази (ЦОГ) – 1 та 2. Блокада ЦОГ-1 призводить відповідно до пригнічення синтезу так званого гастропротективного простагландину E<sub>2</sub>, внаслідок чого відбувається гальмування ангиогенезу, порушення репарації епітелію й індукція синтезу прозапальних медіаторів у тканинах кишківника. Згідно з даними низки джерел літератури, подібні ефекти можуть розвиватись як у разі блокади обох ізоформ ЦОГ, так і за умов селективного інгібування ЦОГ-2, що пов'язано з перемиканням метаболізму арахідонової кислоти з циклооксигеназного на 5-ліпооксигеназний шлях з наступним накопиченням лейкотрієнів та ініціацією вільнорадикального окиснення [2, 13–15]. Лейкотрієни та продукти пероксидації, в свою чергу, активують TLR4, які ініціюють систему запальної реакції й активацію нейтрофілів і подальше пошкодження стінки кишківника. На тлі цих патобіохімічних процесів відбувається гіперекспресія індукцибельної ізоформи синтази оксиду азоту, яка сприяє запуску нітрозуючого стресу з відповідним накопиченням цито- та геномотоксичних сполук, зокрема, нітротирозину, пероксинітриду та вільних радикалів. Дослідженнями *in vitro* показано, що активація TLR4-рецепторів призводить до TLR4-рецептор-опосередкованої стимуляції NADPH-оксидази 2 (Nox2), значної гіперпродукції супероксидрадикалу та до ще більшої активації вільнорадикального окиснення [5, 6, 9, 13]. Наші дослідження також певною мірою підтверджують вищевикладене. Так, на тлі гіперекспресії TLR4 нами був зафіксований значний приріст маркера окисного пошкодження білків – нітротирозину, особливо на тлі введення лабораторним щурам диклофенаку та індометацину, в

середньому в 51,0 разу відносно контрольної групи тварин. Разом з цим, на тлі призначення мелоксикаму нами не було зафіксовано статистично значущих змін цього показника. Подібна динаміка була зафіксована й щодо збільшення у тканині кишківника концентрації 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину. Так, 3-місячне введення диклофенаку та індометацину викликало відповідно в 3,6 і 4,0 разу порівняно з контрольною групою тварин приріст 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину. Нашими попередніми дослідженнями була показана здатність НПЛЗ впливати на процеси повногеномного метилювання ДНК та інтенсифікацію процесів її фрагментації [16]. На нашу думку, TLR4 – опосередкована індукція оксидативного стресу зі значним приростом окисно пошкоджених макромолекул, особливо 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину, може розглядатись як один з можливих молекулярних механізмів епігенетичного пошкодження ДНК на тлі тривалого введення НПЛЗ. Деякими дослідженнями показано, що надлишок 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину здатен збільшувати частоту мутацій та сприяти гіперметилюванню цитозину. Подібний патобіохімічний каскад призводить до прямої цитотоксичної дії в тканині кишківника, а також, за думкою деяких дослідників, може опосередковано ініціювати онкогенез.

Аналіз вмісту фекального кальпротектину в експериментальних тварин показав значне його збільшення на тлі введення ацетилсаліцилової кислоти у 1,8 разу порівняно з контрольною групою тварин, диклофенаку та індометацину в 7,0 і 7,7 разу відповідно (рисунок).

На нашу думку, концентрація фекального кальпротектину відображає спрямованість і вираженість



патологічного процесу в тканині кишківника, оскільки підвищений його рівень корелює зі значним дефектом слизової оболонки та схильністю тканини кишківника до неоплазії [17, 18]. Деякі автори розглядають фекальний кальпротектин як специфічний та інформативний маркер оцінки побічної дії лікарських засобів, що пошкоджують слизову оболонку кишківника, насамперед НПЛЗ [19, 20].

Нами була встановлена висока позитивна кореляція концентрації фекального кальпротектину у тварин на тлі призначення ацетилсаліцилової кислоти, індометаціну та диклофенаку з експресією TLR4 (відповідно  $r = 0,7$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,91$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,9$ ,  $p < 0,0001$ ), з концентрацією 8-OHdG ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,85$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,84$ ,  $p < 0,0001$  відповідно) та Ntz ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,75$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,89$ ,  $p < 0,0001$  відповідно). Разом з цим, мелоксикам не сприяв розвитку значного ефекту на досліджувані показники, що певною мірою може бути пов'язано з його селективністю

відносно ЦОГ-2 ізоформи. Нашими попередніми дослідженнями також було продемонстровано його мінімальний вплив на рівень повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації в кишківнику щурів на тлі тривалого введення [16].

Таким чином, нашими дослідженнями була показана здатність НПЛЗ, особливо індометаціну та диклофенаку ініціювати в тканинах кишківника оксидативний стрес та гіперекспресію TLR4, що згодом може призвести до серйозних небажаних побічних ефектів, зокрема, до пошкодження слизової оболонки кишківника, а також, в окремих випадках, до запуску онкогенезу.

## Висновки

1. НПЛЗ за тривалого введення експериментальним групам щурів здатні впливати на експресію TLR4-рецепторів у тканинах кишківника. Значення всіх НПЛЗ достовірно перевищували показники контрольної групи тварин, а ацетилсаліцилова кислота (збільшення в 1,8 разу відносно контролю),



диклофенак (збільшення в 3,3 разу) та індометацин (збільшення в 2,7 разу) – відповідні показники мелоксикаму.

- 3-місячне введення диклофенаку та індометацину викликало 4-разовий приріст 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину порівняно з контрольною групою тварин, а також у середньому приріст нітритозину в 51,0 разу. Ацетилсаліцилова кислота та, особливо, мелоксикам сприяли розвитку менш вираженого ефекту.
3. Аналіз вмісту фекального кальпротектину в експериментальних тварин показав значне його зростання на тлі введення ацетилсаліцилової кислоти (у 1,8 разу відносно контрольної групи тварин), індометацину та диклофенаку (у 7,7 і 7,0 разу).

Також, було встановлено високу позитивну кореляцію концентрації фекального кальпротектину у тварин на тлі призначення ацетилсаліцилової кислоти, індометацину та диклофенаку з експресією TLR4 ( $r = 0,7$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,91$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,9$ ,  $p < 0,0001$  відповідно), з концентрацією 8-OHdG ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,85$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,84$ ,  $p < 0,0001$  відповідно) і Ntz ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,75$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,89$ ,  $p < 0,0001$  відповідно).

4. Мелоксикам сприяв розвитку менш вираженого ефекту на всі досліджувані показники, що деякою мірою, може бути пов'язано з його селективністю по відношенню до ЦОГ-2 ізоформи.

1. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and gastroprotective NSAIDs on the gastrointestinal tract: a narrative review. S. Rohab, M. Midhun, K. Patel et al. *Cureus*. 2023. V.15 (4). <https://doi.org/10.7759/cureus.37080>.
2. Nagesh Kishan Panchal, Evan Prince Sabina. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a current insight into its molecular mechanism eliciting organ toxicities. *Food Chem. Toxicol.* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113598>.
3. Qurat ul Ain, Batool M., Choi S. TLR4-targeting therapeutics: structural basis and computer-aided drug discovery approaches. *Molecules*. 2020. V 25 (627). <https://doi.org/10.3390/molecules25030627>.
4. Toll-like receptor 4 is a master regulator for colorectal cancer growth under high-fat diet by programming cancer metabolism. Xianjing Hu, Sarwat Fatima, Minting Chen et al. *Cell Death & Disease*. 2021. V. 12 (791). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04076-x>.
5. Inhibition of TLR4 signaling impedes tumor growth in colitis-associated colon cancer. E. Pastille, T. Faßnacht, A. Adamczyk et al. *Front. Immunol.* 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669747>.
6. Burgueno J. F., Abreu M.T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2020. V. 17 (5). P. 263–278. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4>.
7. Receptor expression in the intestinal epithelium reveals distinct spatial, cell type-specific, and temporal patterns. A. E. Price, K. Shamardani, K. A. Lugo et al. *A Map of Toll-like Immunity*. 2018. V. 49 (3). P. 560–575. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.016>.
8. Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. Y. Lu, X. Li, S. Liu et al. *Front. Immunol.* 2018. V. 9 (72). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00072>.
9. Gill R., Tsung A., Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: toll-like receptors. *Free Radic. Biol. Med.* 2010 V. 48. P. 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.006> (2010).
10. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. Bindua S., Mazumder S., Bandyopadhyay U. *Biochemical Pharmacology*. 2020. V. 180. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.
11. Practical manual of biochemistry. Sattanathan G., Padmapriya S.S., Balamuralikrishnan B. 2023, 125 p. <https://doi.org/10.22573/spg.020.BK/S/028>.
12. Engvall E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry*. 2010. V. 56 (2). P. 319–320. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>.
13. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. K. Takeuchi, S. Smale, P. Premchand et al. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2006. V. 4. P. 196–202.

14. Hil'ovská L., Jendželovský R., Fedoročko P. Potency of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chemotherapy (review). *Molecular and Clinical Oncology*. 2014. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.446>.
15. Vane J. R., Botting R. M. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 2003. V. 10. P. 255–258.
16. Бурлака К. А. Вплив тривалого введення нестероїдних протизапальних засобів на рівень повногеномного метилювання ДНК та її фрагментації у щурів. *Вістник проблем біології і медицини*. 2023. Вип. 1 (168). С. 114–119. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-114-119>.
17. International consensus on methodological issues in standardization of fecal calprotectin measurement in inflammatory bowel diseases. F. D'Amico, D. T. Rubin, P. G. Kotze et al. *United European Gastroenterol. J*. 2021. V. 9. P. 451–460. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12069>.
18. Automated fecal biomarker profiling – a convenient procedure to support diagnosis for patients with inflammatory bowel diseases. A. Kraemer, T. Bulgakova, O. Schukina et al. *Clin Lab*. 2020 V. 66 (7). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2020.191029>.
19. Walsham Natalie E., Sherwood Roy A. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2016. V. 9. P. 21–29. <https://doi.org/10.2147/CEG.S51902>.
20. Positive correlation of fecal calprotectin with serum antioxidant enzymes in patients with inflammatory bowel disease: accidental numerical correlation or a new finding? M. Vaghari-Tabari, S. Moein, D. Qujeq et al. *Am. J. Med. Sci*. 2018. V. 355 (5). P. 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.12.009>.

**К. А. Бурлака, С. В. Павлов**

### **Опосередкована TL4-рецепторами побічна дія нестероїдних протизапальних лікарських засобів за тривалого застосування**

Останнім десятиріччям дослідження щодо молекулярних механізмів розвитку небажаних побічних ефектів нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЛЗ) трансформувалися від пригнічення секреції гастропротективних простагландинів до тонких молекулярних механізмів трансформації імунної відповіді, епігенетичних впливів і структурних змін у молекулярної будови функціонально активних молекул. У цьому аспекті певний науковий інтерес викликають молекулярні механізми побічної дії НПЛЗ, які пов'язані зі взаємодією та можливим впливом НПЛЗ на TL-рецептори. Підґрунтям вищезазначеної гіпотези є дослідження, в яких встановлено здатність НПЛЗ, особливо неселективних, індукувати оксидативний і нітрозуючий стрес (за рахунок тривалого пригнічення всіх ізоформ циклооксигенази та дисбалансу простагландинів E2 та F2α) у тканинах шлунково-кишкового тракту за їхнього тривалого застосування, що в свою чергу призводить до гіперактивації TLR4.

*Мета дослідження* – оцінка впливу тривалого введення індометацину, диклофенаку, ацетилсаліцилової кислоти та мелоксикаму на експресію TL4-рецепторів кишківника, маркери окисної деструкції білків (нітритирозин, нуклеїнових кислот (8-гідрокси-2-дезоксигуанозин) та маркер пошкодження кишківника (фекальний кальпротектин).

50 лабораторних щурів-самців масою 250–400 г були розподілені на 5 експериментальних груп (по 10 тварин) наступним чином: 1 – контрольна, тваринам вводили щоденно впродовж 3 місяців розчин натрію хлориду 0,9 %, 2 – щури, яким вводили щоденно індометацин протягом 3 місяців у дозі 0,6 мг/кг, 3 – щури, яким вводили щоденно протягом 3 місяців диклофенак у дозі 0,6 мг/кг, 4 – щури, яким вводили щоденно протягом 3 місяців ацетилсаліцилову кислоту в дозі 0,6 мг/кг і 5 – щури, яким вводили щоденно протягом 3 місяців мелоксикам у дозі 0,1 мг/кг. За допомогою ELISA-методу у тканині кишківника досліджували експресію рецепторів TL4, концентрацію 8-гідрокси-2-дезоксигуанозину (8-OHdG), нітритирозину, фекального кальпротектину в калі.

Тривале введення НПЛЗ, особливо індометацину та диклофенаку, лабораторним щурам призводило до гіперекспресії TL4-рецепторів на тлі суттєвого приросту концентрації 8-OHdG і нітритирозину у тканинах кишківника. Ацетилсаліцилова кислота та, особливо мелоксикам, сприяли розвитку менш вираженого ефекту. Аналіз вмісту фекального кальпротектину в експериментальних тварин показав значне його збільшення на тлі введення ацетилсаліцилової кислоти (у 1,8 разу порівняно з контрольною групою тварин), індометацину та диклофенаку (у 7,7 і 7,0 разу). Також, було встановлено високу позитивну кореляцію концентрації фекального кальпротектину у тварин на тлі призначення ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку та індометацину з експресією TLR4 ( $r = 0,7$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,91$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,9$ ,  $p < 0,0001$  відповідно), з концентрацією 8-OHdG ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,85$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,84$ ,  $p < 0,0001$  відповідно) та нітритирозину ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,75$ ,  $p < 0,0001$ ;  $r = 0,89$ ,  $p < 0,0001$  відповідно). Мелоксикам сприяв розвитку менш вираженого ефекту на всі досліджувані показники, що певною мірою може бути пов'язано з його селективністю відносно ізоформи ЦОГ-2.

*Ключові слова:* нестероїдні протизапальні лікарські засоби, TL4-рецептори, шлунково-кишковий тракт, побічна дія

**TL-4 receptor-mediated adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs under their prolonged use**

In the last decade, researches as to the molecular mechanisms underlying the development of undesirable side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have evolved from the suppression of gastroprotective prostaglandin secretion to intricate molecular mechanisms of immune response transformation, epigenetic influences and structural alterations in the molecular structure of functionally active molecules. In this context, there is of scientific interest the molecular mechanisms of NSAID-induced side effects related to their interaction and potential impact on TL-4 receptors. The basis of the hypothesis is supported by some studies that have identified the ability of NSAIDs, especially non-selective ones, to induce oxidative and nitrosative stress (due to prolonged inhibition of all isoforms of cyclooxygenase and the imbalance of prostaglandins E2 and F2 $\alpha$ ) in the gastrointestinal tissues during their prolonged use, leading to TLR4 hyperactivation.

*The aim of the study* was to evaluate the impact of long-term administration of indomethacin, diclofenac, acetylsalicylic acid, and meloxicam on the expression of TL-4 receptors in the intestine, markers of protein oxidative damage (nitrotyrosine) and nucleic acids (8-hydroxydeoxyguanosine), and marker of intestinal damage (fecal calprotectin).

50 laboratory rats weighing 250–400 g were divided into five experimental groups (10 animals each) as follows: 1<sup>st</sup> group – control, receiving daily 0.9% sodium chloride solution for 3 months, 2<sup>nd</sup> group – rats receiving daily indomethacin for 3 months at a dose of 0.6 mg/kg, 3<sup>rd</sup> group – rats receiving daily diclofenac for 3 months at a dose of 0.6 mg/kg, 4<sup>th</sup> group – rats receiving acetylsalicylic acid daily for 3 months at a dose of 0.6 mg/kg and 5<sup>th</sup> group – rats receiving meloxicam daily for 3 months at a dose of 0.1 mg/kg. TLR4 expression, 8-hydroxydeoxyguanosine and nitrotyrosine concentration in the intestinal tissue, and fecal calprotectin content were investigated using the ELISA method.

Long-term administration of NSAIDs, especially indomethacin and diclofenac, to laboratory rats led to hyperexpression of TLR4 along with a significant increase in the concentration of 8-OHdG and nitrotyrosine in the intestinal tissues. Acetylsalicylic acid and, particularly, meloxicam contributed to a less pronounced effect. Analysis of fecal calprotectin content in the experimental animals showed a significant increase when acetylsalicylic acid was administered (by 1.8-fold compared to the control group), indomethacin, and diclofenac (by 7.7-fold and 7.0-fold). Additionally, a high positive correlation was found between the concentration of fecal calprotectin in animals receiving acetylsalicylic acid, diclofenac, and indomethacin with TLR4 expression ( $r = 0.7, p < 0.0001$ ;  $r = 0.91, p < 0.0001$ ;  $r = 0.9, p < 0.0001$ ), concentrations of 8-OHdG ( $r = 0.8, p < 0.0001$ ;  $r = 0.85, p < 0.0001$ ;  $r = 0.84, p < 0.0001$ ) and nitrotyrosine ( $r = 0.88, p < 0.0001$ ;  $r = 0.75, p < 0.0001$ ;  $r = 0.89, p < 0.0001$ ). Meloxicam contributed to a less pronounced effect on all the investigated parameters, which can be attributed, by some extent, to its selectivity for the COX-2 isoform.

*Key words:* non-steroidal anti-inflammatory drugs, TL-4 receptors, gastrointestinal tract, adverse effects

---

Надійшла: 2 серпня 2023 р.

Прийнята до друку: 23 серпня 2023 р.

**Контактна особа:** Павлов Сергій Васильович, кафедра клінічної лабораторної діагностики, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет. Тел.: +38 0 97 7970884. Електронна пошта: svpavlov1980@gmail.com