

**Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

**ГОЛОТА ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА**

**УДК 616.345-008.6-02+615.33.065]:612-092.9**

**БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СТАНУ КИШКОВОГО БАР'ЄРУ У  
ВІДДАЛЕНІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Толстанова Ганна Миколаївна,**  
Київський національний університет імені  
Тараса Шевченка МОН України,  
начальник Науково-дослідної частини

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, доцент  
**Фоменко Ірина Степанівна,**  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького, професор кафедри  
біологічної хімії;

член-кореспондент НАН України,  
професор, доктор біологічних наук  
**Коваленко Надія Костянтинівна,**  
Інститут мікробіології і вірусології імені  
Д.К. Заболотного НАН України,  
провідний науковий співробітник відділу фізіології  
промислових мікроорганізмів

Захист відбудеться «20» листопада 2017 року о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12

Автореферат розісланий «18» жовтня 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24

Н.Г. Ракша

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Антибіотики широко використовуються в сучасній клінічній практиці для лікування бактеріальних інфекцій [Дземан М.І., 2008; Levy E.R., 2012; Woon S.A., 2016]. Їх емпіричне призначення, а також швидкий розвиток бактеріальної резистентності часто вимагає корекції терапії, іноді до трьох видів антибіотиків [Blaser M., 2011]. Епідеміологічні дослідження показали, що використання антибіотиків суттєво підвищує ризик розвитку численних захворювань [Mårild K., 2013; Horton D.B., 2015; Scott F.I., 2016], в тому числі запальних захворювань кишечника (ЗЗК) [Hviid A., 2011; Shaw S.Y., 2011; Kronman M.P., 2012]. Крім того показано, що антибіотики впливають на чутливість до інфекцій шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [Włodarska M., 2011]. Оскільки підвищення сприйнятливості до різних захворювань може виникати на тлі використання широкого спектру антимікробних препаратів [Кноор К.А., 2016], очевидно, що причиною цього явища є не побічні реакції окремих груп антибіотиків, а загальні, притаманні всім групам властивості.

Відомо, що антибактеріальна терапія призводить до змін у складі кишкової нормобіоти, які є причиною розвитку порушень з боку ШКТ у 3-62% хворих [Francino M.P., 2015]. Однак механізми взаємозв'язку цих порушень із підвищеним ризиком розвитку ЗЗК залишаються недостатньо з'ясованими. Припускають, що дисбаланс мікробіоти у зв'язку із застосуванням антибіотиків, може бути стійким і тривалий час впливати на імунну толерантність ШКТ та чутливість до патогенів, що сприяє розвитку запальних захворювань [Rashid M., 2015; Dethlefsen L., 2011; Shaw S.Y., 2011].

В останні роки набуває актуальності вивчення процесів обміну низькомолекулярними метаболітами між мікробіотою і макроорганізмами. Одним з найважливіших метаболітів кишкової мікробіоти є коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) [Wong J.M., 2006], фізіологічний ефект яких опосередковується КЛЖК-специфічними FFA2 та FFA3 рецепторами, зв'язаними з G-білками [Brown A.J., 2003; Le Poul E., 2003; Nilsson N.E., 2003]. КЛЖК, особливо бутират, слугують важливим джерелом енергії для клітин епітелію товстої кишки, забезпечуючи близько 60-70% їх енергетичних потреб. Вони регулюють перистальтику товстої кишки, рН кишкового вмісту, абсорбцію електролітів і поживних речовин [Thangaraju M., 2008], забезпечують підтримання бар'єрної функції кишечника через вплив на щільні контакти [Peng L., 2009] та збільшення синтезу MUC2 [Hatayama H., 2007]. Крім того, ці кислоти відіграють важливу роль в регуляції як локального, так і системного імунітету. Протизапальні функції КЛЖК реалізуються шляхом модуляції хемотаксису імунних клітин, регуляції вивільнення активних форм кисню і цитокінів [Saemann M.D., 2000; Yin L., 2001]. У зв'язку з біологічною значимістю КЛЖК у підтриманні гомеостатичних показників функціонування ШКТ, вони є найбільш вірогідними посередниками в механізмах розвитку віддалених наслідків антибіотикотерапії.

Віддалені наслідки антибіотикотерапії, зокрема вплив на рівень КЛЖК та КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів, що опосередковують їх дію на організм, не встановлені. Також відкритим залишається питання про взаємозв'язок між метаболічною активністю мікробіоти та біохімічними показниками інтегративної цілісності кишкового бар'єру.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетних тем «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.). Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 8 від 23 березня 2015 року. Уточнену редакцію теми дисертаційного дослідження затверджено на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 8 від 13 лютого 2017 року.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було оцінити біохімічні показники стану кишкового бар'єру в залежності від вмісту КЛЖК та КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів у різні терміни після введення антибіотика цефтриаксону.

Відповідно до зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

1. Визначити вміст КЛЖК дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.
2. Встановити рівень та локалізацію рецепторів і транспортерів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.
3. Дослідити стан окисно-антиоксидантного балансу, експресію редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, HIF1 $\alpha$  та рівень активації ERK1/2 і p38 MAP-кіназних шляхів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.
4. Визначити концентрацію глікопротеїнів та вуглеводний склад поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.
5. Дослідити показники бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів та їх чутливість до дії ульцерогенних чинників у віддалені терміни після введення цефтриаксону.

*Об'єкт дослідження:* біохімічні механізми функціональних порушень слизової оболонки товстої кишки після введення цефтриаксону.

*Предмет дослідження:* вміст КЛЖК та КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів у дистальному відділі товстої кишки щурів; окисно-антиоксидантна рівновага в клітинах слизової оболонки товстої кишки; вуглеводний склад та загальна концентрація глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів; проникність епітелію товстої кишки.

*Методи дослідження:* біохімічні, хроматографічні, колориметричні, молекулярно-біологічні, імуногістохімічні, цитохімічні, гістологічні, бактеріологічні методи та методи варіаційної статистики.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше встановлено, що введення антибіотика цефалоспоринового ряду цефтриаксону призводить до тривалого зниження концентрації КЛЖК, яке асоційоване зі змінами у рівні КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів, що опосередковують ефект даних кислот на організм. Експериментально підтверджено, що введення антибіотика призводить до активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, NF1 $\alpha$  та пов'язаних з ними ERK1/2 MAP-кіназ. Вперше встановлено, що у віддалені терміни після антибіотикотерапії характерною ознакою структури олігосахаридів молекул глікопротеїнів слизу є передчасне їх термінування, яке асоціюється зі зниженням концентрації гексоз і фукози та підвищенням сіалових кислот. Встановлено, що введення цефтриаксону впродовж 14 діб підвищує чутливість до розвитку експериментального коліту у віддалені терміни після введення антибіотика.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані експериментальні дані є підґрунтям для: розробки рекомендацій щодо моніторингу віддалених наслідків антибіотикотерапії у пацієнтів з хронічними інфекційними захворюваннями, які часто отримують антибактеріальні препарати і, відповідно, є групою ризику; пошуку профілактичних засобів для попередження цих наслідків, зокрема направлених на підтримання сталого рівня метаболічної активності кишкової мікробіоти та інтегративної цілісності кишкового бар'єру.

Матеріали дисертації впроваджені в навчальний процес ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка на кафедрі біофізики при викладанні спецкурсу «Основи сучасної фармакології» і кафедрі мікробіології та загальної імунології при викладанні спецкурсу «Мікроекологія людини», а також можуть бути рекомендовані до включення у спецкурси медико-біологічного профілю вищих навчальних закладів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно проведено інформаційний пошук, експериментальні дослідження, аналіз та статистичне опрацювання результатів дослідження. Формування ідеї роботи, планування схеми експерименту та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків проведено за участю наукового керівника. Допомогу в проведенні хроматографічних досліджень надавав завідувач Лабораторії біологічних полімерних сполук Центру колективного користування НАН України при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, к.б.н. Остапчук А.М.; Вестерн-блот аналізу – м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М.; лабораторних досліджень – м.н.с., к.б.н. Довбинчук Т.В.; мікробіологічних досліджень – доц., к.б.н. Сергійчук Т.М.; гістологічних – доц., к.б.н. Варенюк І.М. та пров. інж. Рослова Н.М.;

імуногістохімічних – м.н.с., к.б.н. Дзюбенко Н.В. та к.б.н. Ізумі Каджі (США), що відображається у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: 9<sup>th</sup> International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (ISCTICO) (Краків, Польща, 2016); Joint Meeting of the American Physiological Society and The Physiological Society “Physiology 2016” (Дублін, Ірландія, 2016); Early Career Physiologists' Symposium (ECPS 2016) (Дублін, Ірландія, 2016); XII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016); II міжнародній науковій конференції “Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century” (Київ, 2016); 15<sup>th</sup> International Conference of Ulcer Research (Оттава, Канада, 2015); науково-практичній конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (Київ, 2015); конференції-конкурсі молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015” (Київ, 2015), XIII Міжнародній науковій конференції молодих науковців «Шевченківська весна 2015: біологія» (Київ, 2015).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 16 наукових робіт, що відображають основний зміст дисертаційної роботи: 5 статей у фахових наукових виданнях рекомендованих ДАК України (з яких 2 статті у наукових виданнях України, що включені до міжнародних наукометричних баз) та 1 стаття у нефаховому виданні, а також 10 тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення, аналізу й узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел, який складається з 213 найменувань. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 145 сторінках (з яких основна частина займає 120 сторінок), ілюстрована 3 таблицями та 30 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені на білих нелінійних щурах-самцях, масою 140-160 г (n=184), які утримувались за стандартних умов акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Дослідження відповідають основним вимогам Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») та погоджені біоетичною комісією ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол №8 від 2.11.2015 р.

Тваринам щодня впродовж 14 діб внутрішньом'язово вводили цефтриаксон (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна) у дозі 300 мг/кг ( $n = 80$ ). Для визначення рівня редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 цефтриаксон вводили впродовж 5 діб ( $n = 6$ ). Тваринам контрольної групи ( $n = 78$ ), відповідно, 0,1 мл води для ін'єкцій. Щурів виводили з експерименту на 6, 15, 29 та 72 добу від початку дослідження. Під час аутопсії видаляли ділянку товстої кишки від анального отвору до сліпої кишки.

Для визначення змін чутливості кишкового бар'єру до дії ульцерогенних чинників на 72 добу експерименту моделювали експериментальний коліт у щурів ( $n = 10$ ) одноразовим ректальним введенням 0,1 мл 3% йодоацетаміду (Sigma, США) в 1% розчині метилцелюлози. Щурам контрольної групи ( $n = 10$ ) вводили 0,1 мл 1% метилцелюлози. Аутопсію тварин та оцінку макроскопічних змін товстої кишки проводили через 6 год після введення йодоацетаміду.

Вміст КЛЖК у фекаліях щурів визначали методом газової хроматографії [Ардатская М.Д., 2003]. Окремі КЛЖК визначали за часом утримання стандартів відповідних кислот та обчислювали їх вміст методом нормування площин піків щодо площі піку внутрішнього стандарту (4-метилвалеріанова кислота).

Загальну концентрацію протеїнів у тотальному екстракті слизової оболонки товстої кишки (СОТК) визначали за допомогою набору Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, США). Рівень специфічних протеїнів визначали методом Вестерн-блот з використанням первинних антитіл: Egr-1, Sp-1, ERK1, ERK2, pERK, p38  $\alpha/\beta$ , pp38,  $\beta$ -актин (Santa-Cruz, США); FFA2, FFA3 (West LA VA Medical Center, США) та HIF1 $\alpha$  (Novus Biologicals, США). Рівень та локалізацію MCT1, MCT4, SMCT1 транспортерів, а також FFA2 і FFA3 рецепторів КЛЖК визначали імуногістохімічно.

Каталазну активність в СОТК визначали колориметрично за методом Королюк [Королюк М.А., 1988]. Супероксиддисмутазну (СОД) активність - методом нативного електрофорезу в поліакриламідному гелі. Визначення проводили на основі здатності СОД конкурувати з нітросинім тетразолієм за супероксидні аніони, що утворюються в результаті фоторедукції рибофлавіну [Bertrand R.L., 2014]. Рівень ТБК-активних сполук визначали у безбілковій фракції згідно методу Стальної [Стальная И.Д., 1977]. Рівень загальних і небілкових тіолових груп визначали за реакцією з реактивом Елмана. Рівень білкових SH-груп розраховували за різницею між показниками вмісту загальних і небілкових SH-груп [Ellman G.L., 1959].

Поверхневий слиз кишки щурів відділяли від шару епітеліальних клітин за допомогою розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну [Komuro Y., 1991]. Відносний вміст глікопротеїнів слизу визначали за допомогою Шиф-реакції на PVDF-мембрані [Akiba Y., 2000], концентрацію – за реакцією з реактивом Фоліна після виділення глікопротеїнів слизу сульфосаліциловою кислотою та їх осадження фосфорно-вольфрамовою кислотою [Романенко Е.Г., 2012]. Концентрацію гексоз поверхневого слизу товстої кишки визначали за реакцією з орциновим реактивом [Колб В.Г., 1976], фукози – методом Діше-Шеттлз [Dishe Z., 1948], гексозамінів –

за реакцією з ацетилацетоном у лужному середовищі [Романенко Е.Г., 2013], сіалових кислот – методом Гесса [Колб В.Г., 1976].

Активність матричних металопротеїназ (ММП), ММП-2 та ММП-9, в СОТК визначали методом зимографії [Toth M., 2001]. Проникність епітелію товстої кишки визначали за різницею вмісту фарби Еванс синій в крові ворітної вени через 30, 60 та 90 хв після введення у просвіт кишки [Афіцька А.І., 2015]. Загальну кількість мікроорганізмів у крові визначали методом бактеріологічного посіву на 5% кров'яний агар.

Морфометричний аналіз товстої кишки проводили на парафінових зрізах (3-5 мкм) забарвлених гематоксиліном-еозинном. Для цитохімічної ідентифікації тучних та келихоподібних клітин використовували набори толуїдинового та альціанового синього (ТОВ "БиоВитрум", Росія), відповідно.

Рівень інтерлейкіну 10 (ІЛ-10) та фактору некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) в сироватці крові щурів визначали за допомогою наборів реагентів для імуноферментного визначення концентрації ІЛ-10 та ФНП- $\alpha$  (Вектор-Бест, Росія) згідно протоколу виробника.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0. Для оцінки кількісних показників визначали середнє значення (M) та стандартну похибку середнього (m). Для всіх наявних вибірок перевірена гіпотеза нормальності розподілу за методом Шапіро-Уїлка. Показник вірогідності розраховували за допомогою t-критерію Стьюдента для вибірок з нормальним розподілом або на основі рангового непараметричного критерію Манна-Уїтні для ненормально розподілених вибірок. Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (p) приймався рівним 0,05.

## Результати досліджень та їх обговорення

**Вміст КЛЖК та рівень КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів у дистальному відділі товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.** Мікробіота кишечника перебуває в тісному метаболічному зв'язку з макроорганізмом, вагома роль у здійсненні якого належить локальному синтезу КЛЖК [Lee W.J., 2014; Vogt S.L., 2015; Mathewson N.D., 2016]. Нами встановлено, що на 15 добу експерименту введення цефтриаксону призводило до зниження загального вмісту КЛЖК та вмісту оцтової, пропіонової, масляної кислот у дистальному відділі товстої кишки щурів у 4,8, 2,9, 13,8 та 8,5 рази (p < 0,05), відповідно (рис. 1). Вміст валеріанової, ізовалеріанової та капронової кислот був нижче рівня детекції після введення цефтриаксону. Ці зміни супроводжувались зниженням в 4,3 рази (p < 0,05) значення анаеробного індексу (відношення суми пропіонової і масляної кислот до вмісту оцтової кислоти) та, відповідно, підвищенням відносного вмісту оцтової кислоти (рис. 2). На 72 добу вміст КЛЖК залишався нижчим контрольних показників (особливо пропіонової кислоти), але вищим, ніж на 15 добу експерименту. Анаеробний індекс був зниженим в 1,3 рази (p < 0,05) порівняно з контролем.

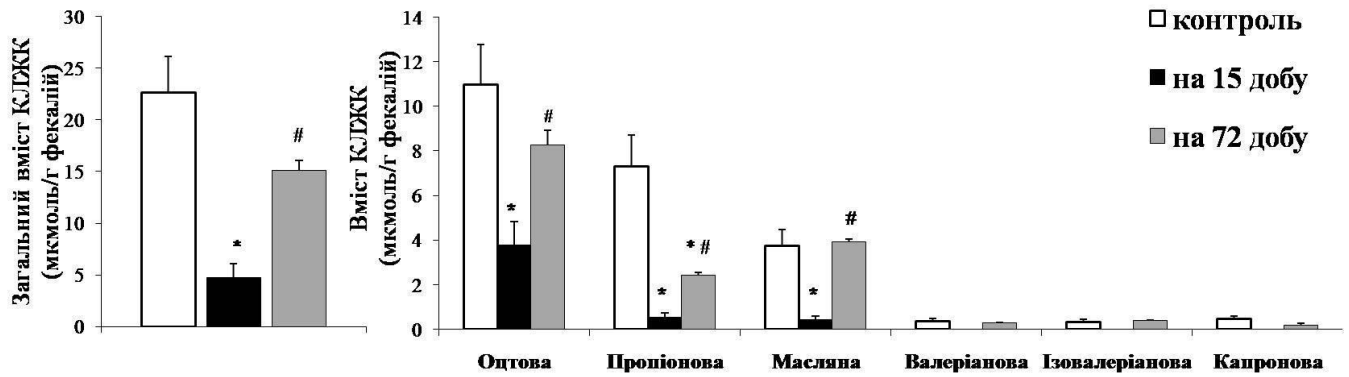


Рис. 1. Вміст КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів на 15 та 72 добу після початку введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб);  $M \pm m$ ;  $n = 12$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно показників у контрольній групі; # –  $p < 0,05$  відносно значень, отриманих на 15 добу.

З огляду на те, що КЛЖК є основним енергетичним субстратом для ентероцитів [Thangaraju M., 2008], зниження їх вмісту може призводити до порушення гомеостазу клітин СОТК. Зниження анаеробного індексу може вказувати на прозапальні властивості внутрішньопорожнинного середовища

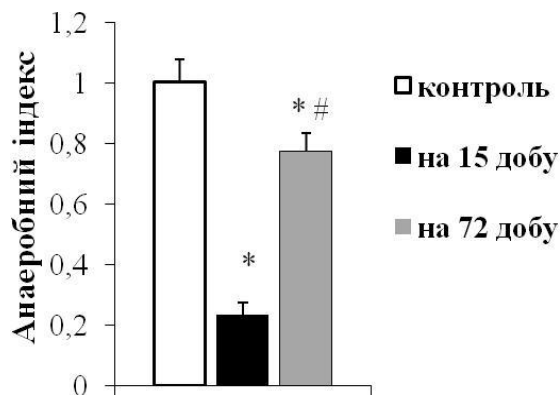


Рис. 2. Анаеробний індекс на 15 та 72 добу після початку введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб);  $M \pm m$ ;  $n = 12$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно показників у контрольній групі; # –  $p < 0,05$  відносно значень, отриманих на 15 добу.

товстої кишки щурів після введення цефтриаксону, оскільки показано, що пропіонова і масляна кислоти мають однаковий протизапальний потенціал, в той час як оцтова кислота виявляє значно меншу ефективність [Tedelind, 2007].

З фекаліями виводиться 5-10% від загальної кількості КЛЖК [Wong J.M., 2006], тому спостережувані нами зміни характеризують лише частину синтезованих КЛЖК. КЛЖК дуже ефективно всмоктуються в товстій кишці шляхом пасивної дифузії, за участю  $Na^+$ -залежних SMCT та  $H^+$ -залежних MCT мембранних транспортерів [Ganapathy V., 2008; Thibault R., 2010; Halestrap A.P., 2013].

Проведене нами імуногістохімічне дослідження на 15 добу експерименту показало підвищення імунореактивності MCT1 та MCT4 транспортерів КЛЖК на базолатеральній мембрані ентероцитів та зниження SMCT1 транспортера на щітковій облямівці ентероцитів СОТК щурів після введення цефтриаксону (рис. 3).

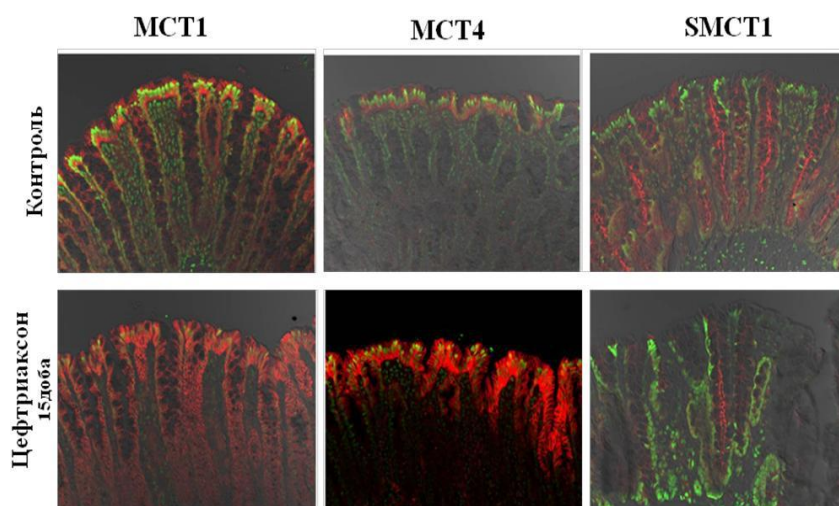


Рис. 3. Імунореактивність MCT1, MCT4 і SMCT1 транспортерів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): імуногістохімія (позитивне забарвлення – червоний колір),  $\times 400$ ;  $n = 6$ .

Сигнальні та імуномодуляторні функції КЛЖК здійснюються через взаємодію з FFA2 (GPR43) та FFA3 (GPR41) рецепторами [Kim C.H., 2014]. FFA2 рецептори мають вищу спорідненість до оцтової кислоти [Milligan G., 2009], експресуються переважно на імунних клітинах та опосередковують ефект КЛЖК на перебіг запалення в кишечнику [Maslowski K.M., 2009; Sina C.G., 2009]. Нами показана імунореактивність FFA2 рецепторів на келихоподібних клітинах та поверхневих ентероцитах СОТК щурів (рис. 4А). Після введення цефтриаксону впродовж 14 діб, імунореактивність FFA2 в СОТК знижувалась. Результати Вестерн-блот аналізу показали зниження рівня FFA2 навіть на 72 добу експерименту (рис. 4Б).

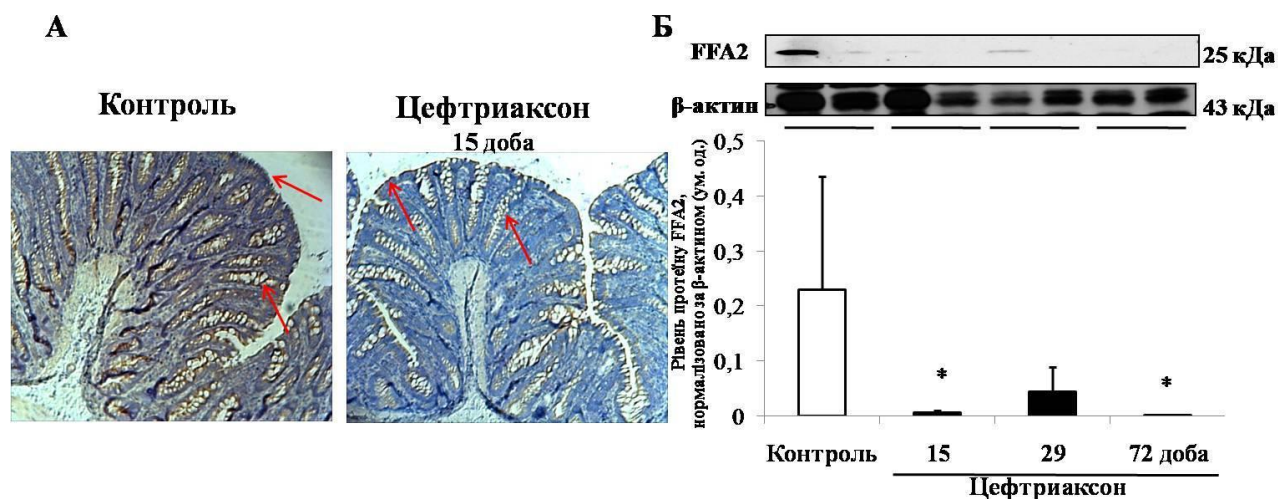


Рис. 4. Рівень FFA2 рецепторів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): А – імуногістохімія, FFA2-позитивне забарвлення – коричневий колір (стрілками вказана локалізація),  $\times 100$ ; Б – Вестерн-блот;  $M \pm m$ ;  $n = 16$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно показників у контрольній групі.

FFA3 рецептори, на відміну від FFA2, мають вищу спорідненість до масляної кислоти [Hudson B.D., 2012] та експресуються переважно в кишечнику,

жировій тканині, клітинах підшлункової залози [Brown A.J., 2003; Maslowski K.M., 2009]. Результати наших досліджень показали, що за умов норми, FFA3 рецептори локалізуються на поверхневих ентероцитах товстої кишки щурів, келихоподібних клітинах і нейронах ентеральних плетив (рис. 5А). Рівень FFA3 рецепторів після введення цефтриаксону знижувався в 9,3 раза ( $p < 0,05$ ) на 15 добу експерименту, проте на 29 та 72 добу статистично вірогідно не відрізнявся від контрольних значень (рис. 5Б).

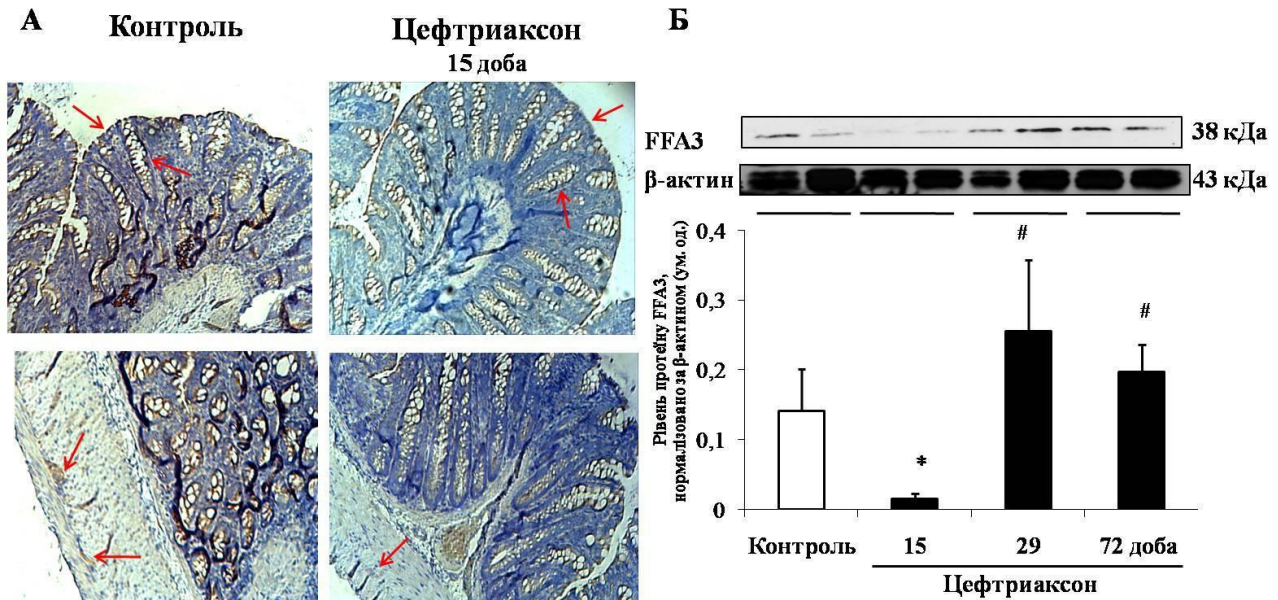


Рис. 5. Рівень FFA3 рецепторів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): А – імуногістохімія, FFA3-позитивне забарвлення – коричневий колір (стрілками вказана локалізація),  $\times 100$ ; Б – Вестерн-блот;  $M \pm m$ ;  $n = 16$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно показників у контрольній групі, # –  $p < 0,05$  відносно показників, отриманих на 15 добу.

Отже, введення цефтриаксону викликає суттєві та тривалі зміни концентрації КЛЖК та рівня їх рецепторів і транспортерів в СОТК щурів, що свідчить про порушення процесів обміну метаболітами між мікробіотою та макроорганізмом.

**Характеристика бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.** Оскільки КЛЖК виконують важливу роль в енергозабезпеченні ентероцитів [Donohoe D.R., 2011], ми припустили, що зниження метаболічної активності кишкової мікробіоти після введення антибіотика може призводити до порушень окисно-антиоксидантного балансу в клітинах слизової оболонки товстої кишки. Показано, що оксидативний стрес є одним з основних механізмів залучених в патогенез ЗЗК [Mouga F.A., 2015; Kruidenier L., 2003]. Результати нашого дослідження показали підвищення вмісту ТБК-активних сполук у слизовій оболонці товстої кишки щурів на 15 і 29 добу експерименту в 4,1 та 2,9 раза ( $p < 0,05$ ), відповідно, після введення цефтриаксону

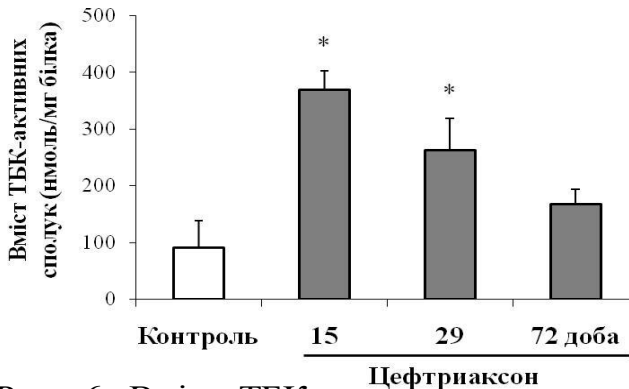


Рис. 6. Вміст ТБК-активних сполук у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб);  $M \pm m$ ;  $n=30$ ; 1 – контроль, 2 – цефтриаксон; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

оболонки товстої кишки за умов водно-імобілізаційного та адреналін-індукованого стресу [Фоменко І.С., 2015].

(рис. 6). Ці зміни супроводжувались дисбалансом активності ферментів антиоксидантного захисту (рис. 7).

СОД активність в СОТК щурів після введення цефтриаксону була вірогідно зниженою в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) на 29 та 72 добу експерименту. Каталазна активність в СОТК знижувалась в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) на 15 добу експерименту, однак на 29 та 72 добу відмічалось збільшення її активності.

Зростання концентрації ТБК-активних сполук та коливання активності ферментів антиоксидантного захисту створюють передумови для розвитку деструктивних ушкоджень слизової

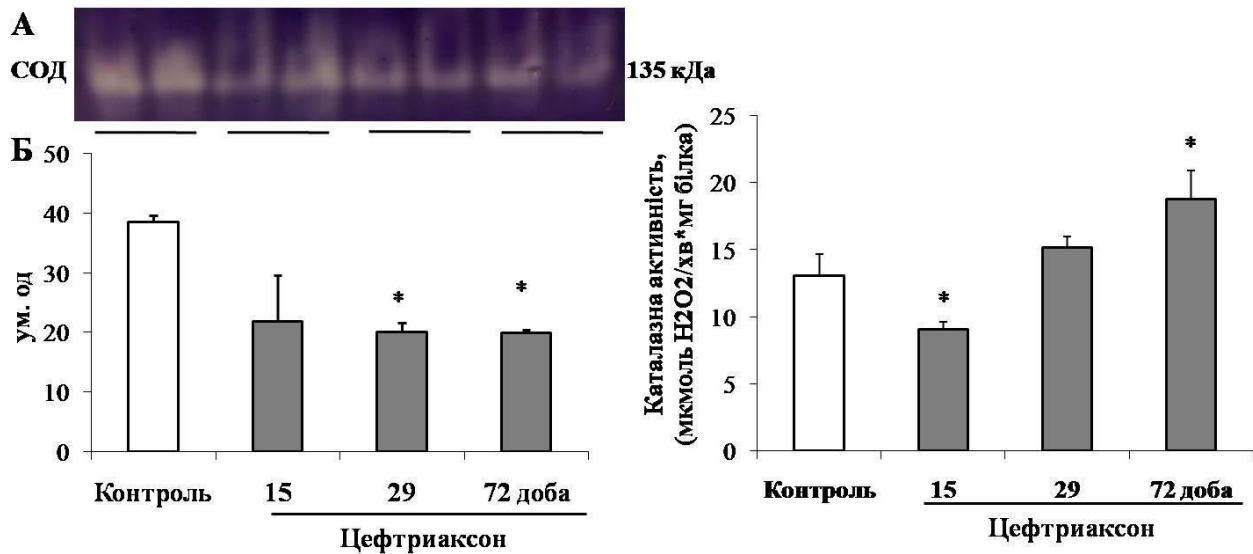


Рис. 7. Супероксиддисмутазна та каталазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); А – електрофореграма після детекції СОД активності, Б – результати денситометрії;  $M \pm m$ ;  $n=30$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Порушення окисно-антиоксидантної рівноваги може модулювати численні редокс-чутливі сигнальні шляхи через окиснення SH-груп цистеїну білкових молекул. Нами було виявлено зниження вмісту білкових SH-груп в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) після введення цефтриаксону на 15 добу експерименту (рис. 8), що

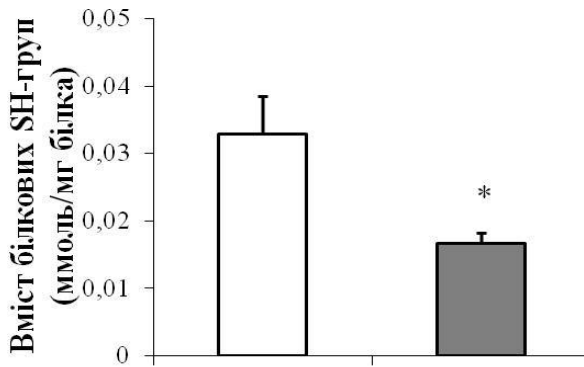


Рис. 8. Вміст білкових SH- груп у слизовій оболонці товстої кишки щурів на 15 добу експерименту;  $M \pm m$ ;  $n = 30$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

передбачає активацію редокс-чутливих транскрипційних факторів. Враховуючи те, що Egr-1 та Sp-1 є редокс-чутливими транскрипційними факторами ранньої відповіді, які беруть участь в регуляції метаболізму, росту, диференціації, ангиогенезу і апоптозу [Ryu H., 2003; Pagel J.I., 2012], ми визначили рівень даних протеїнів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5 та 14 добового введення цефтриаксону, відповідно на 6 та 15 добу експерименту. Вірогідне підвищення рівня Egr-1 та Sp-1 порівняно з контролем в 1,8 та 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), відповідно, було виявлено лише на 6 добу експерименту (рис. 9). Тоді як рівень гіпоксія-чутливого транскрипційного фактору HIF1 $\alpha$  в СОТК зростав в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) на 15 добу експерименту (рис. 10).

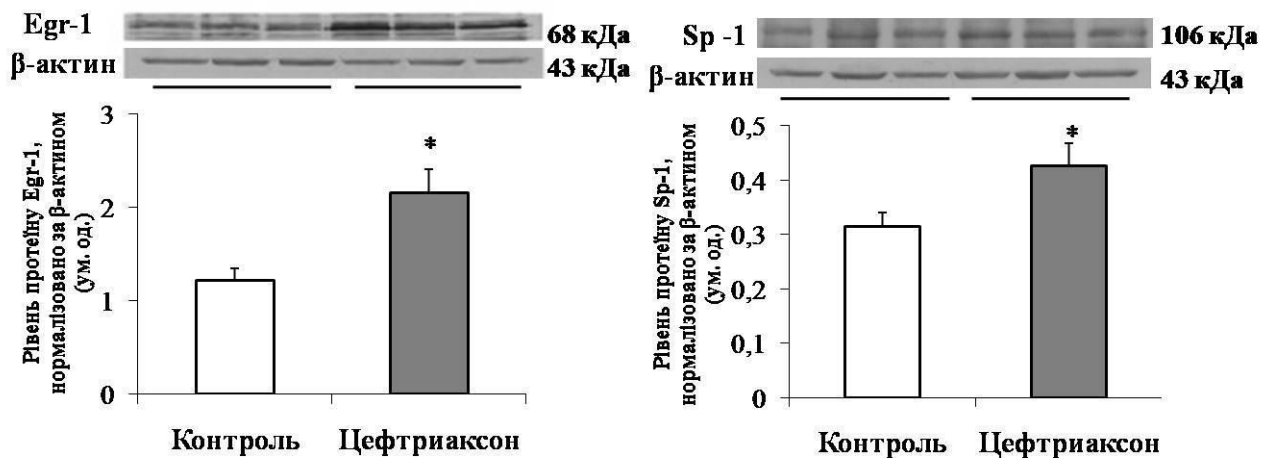


Рис. 9. Рівень транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м.); Вестерн-блот;  $M \pm m$ ;  $n = 6$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Оскільки запалення та гіпоксія нерозривно пов'язані між собою [Campbell E.L., 2014], підвищення рівня HIF1 $\alpha$  в СОТК після введення цефтриаксону є свідченням розвитку прозапальних змін у відповідь на порушення окисно-антиоксидантного балансу. Ці зміни супроводжувалися зростанням рівня фосфорильовання ERK1/2 та зниженням p38 MAP-кіназ (рис. 11). Показано [Otsuka M., 2010], що інактивація p38 в клітинах СОТК веде до збільшення активності ERK1/2 MAP-кіназ та підвищує чутливість мишей до розвитку коліту за рахунок зменшення кількості келихоподібних клітин.

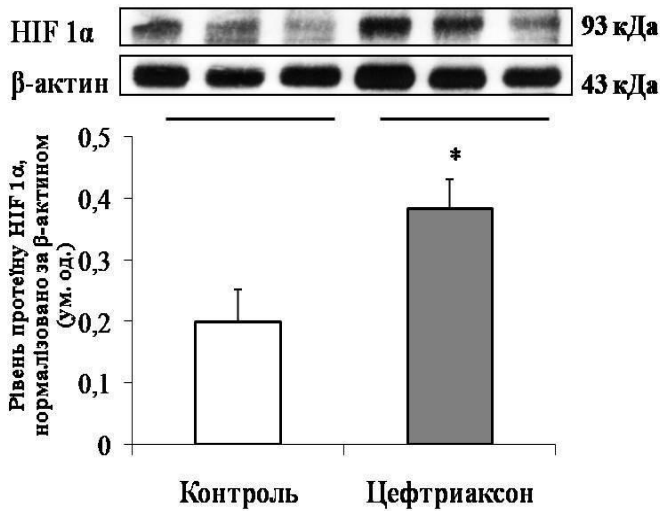


Рис. 10. Рівень транскрипційного фактору HIF1 $\alpha$  у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м.); Вестерн-блот;  $M \pm m$ ;  $n=6$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

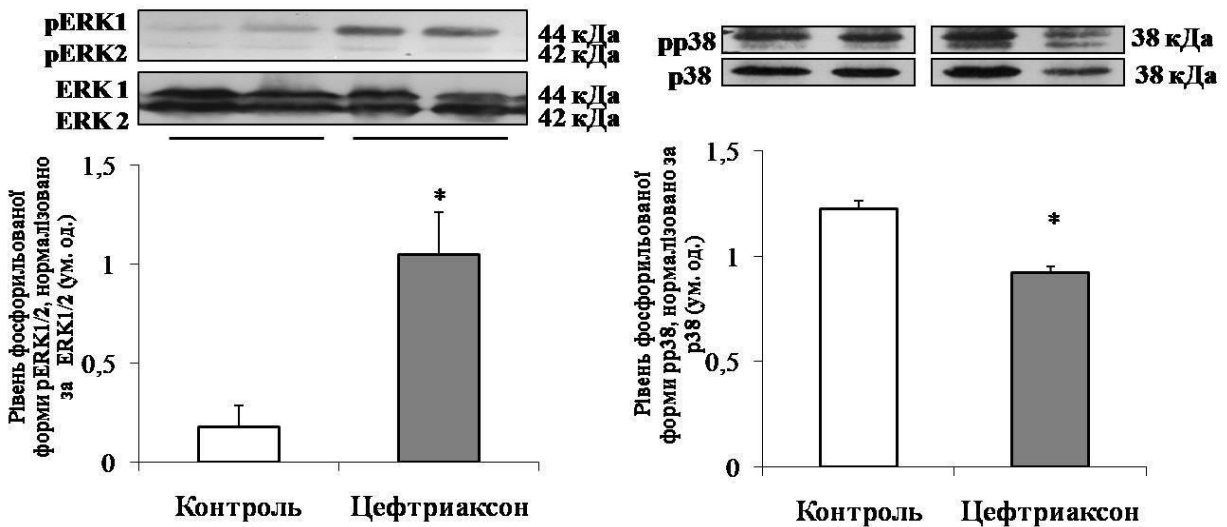


Рис. 11. Рівень фосфорильовання ERK1/2 та p38 MAP-кіназ у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 дів); Вестерн-блот;  $M \pm m$ ;  $n = 4$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Вірогідне зниження концентрації глікопротеїнів було виявлено лише на 72 добу експерименту (рис. 12). Це супроводжувалось якісними змінами структури олігосахаридних ланцюгів молекул глікопротеїнів (рис. 13), зокрема зниженням концентрації гексоз і фукози в 1,2 та 3,1 раза ( $p < 0,05$ ), відповідно. Концентрація гексозамінів, які локалізуються переважно в коровій частині олігосахаридів муцину, не змінювалась на 72 добу експерименту, однак сіалових кислот, які займають термінальне положення, збільшувалась в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ).

Важливою складовою в підтриманні бар'єрної функції кишечника є приепітеліальний шар слизу, секретований келихоподібними клітинами [Johansson M.E., 2013]. Ми з'ясували, як змінюється вуглеводний склад та загальний вміст глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону. Для визначення рівня глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів ми застосували два методи: реакцію з реактивом Фоліна, який зв'язується з білковою частиною молекул глікопротеїнів та Шиф-реакцію на PVDF- мембрані, яка визначає глікопротеїни за вуглеводним компонентом молекул.

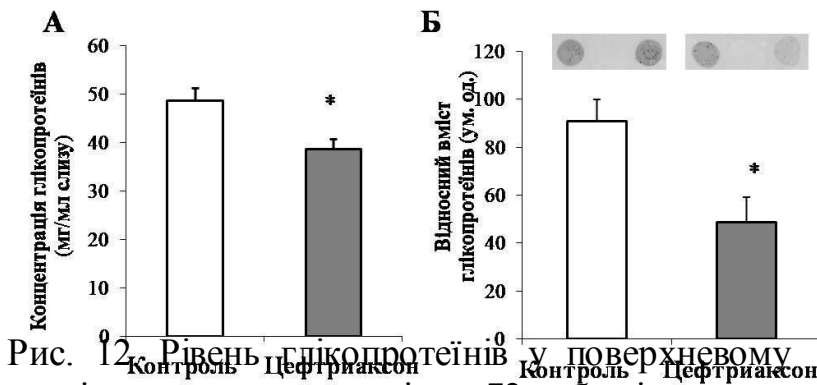


Рис. 12. Рівень глікопротеїнів у слизі товстої кишки щурів на 72 добу від початку введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): А – реакція з реактивом Фоліна після виділення сульфосаліциловою кислотою; Б – метод Шиф-реакції на PVDF-мембрані; М ± m; n = 24; \* – p < 0,05 відносно контролю.

в'язкості слизу [Campbell B.J., 2001; Johansson M.E., 2014], що в свою чергу, є причиною порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єру. Порушення гомеостазу СОТК підтверджувалось збільшенням протеолітичної активності ММП-9 та зниженням – ММП-2 після введення цефтриаксону на 72 добу експерименту (рис.14). Карг зі співав. [Garg P., 2009] показали, що ММП-9 є тригером ЗЗК, а ММП-2, навпаки, має захисні властивості.

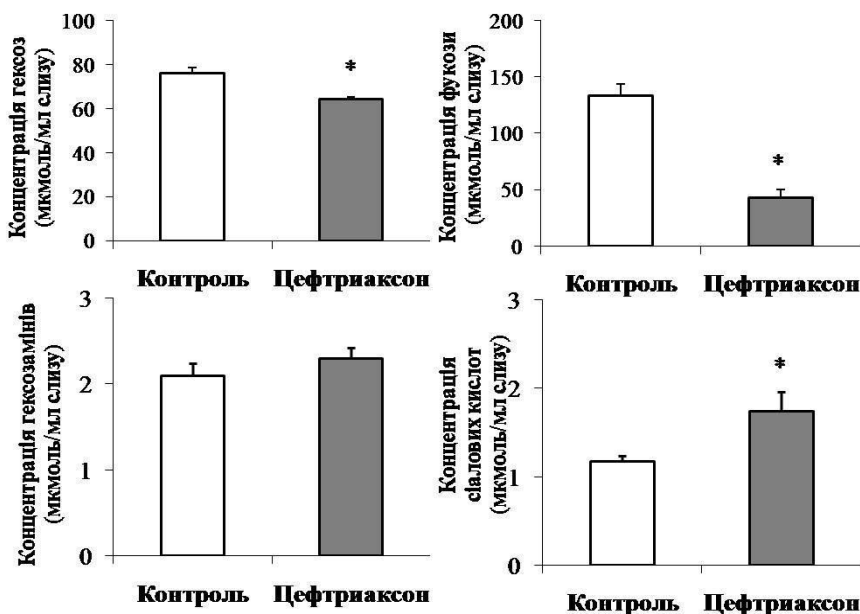


Рис. 13. Концентрація гексоз, фукози, гексозамінів та сіалових кислот поверхневого слизу товстої кишки щурів на 72 добу від початку введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); М ± m; n = 24; \* – p < 0,05 відносно контролю.

Отже, введення цефтриаксону впродовж 14 діб викликає тривале порушення окисно-антиоксидантного балансу, що призводить до перебудови

Виявлені зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни цефтриаксону свідчать про вкорочення вуглеводних ланцюгів молекул глікопротеїнів та передчасне їх термінування залишками сіалових кислот. Подібний характер змін складу слизу є типовим під час розвитку ЗЗК[Okada Y., 1994;

Campbell B.J., 2001]. Описані зміни можуть призводити до порушення

вуглеводного складу глікопротеїнів слизу і зрушень у гомеостазі слизової оболонки товстої кишки щурів.

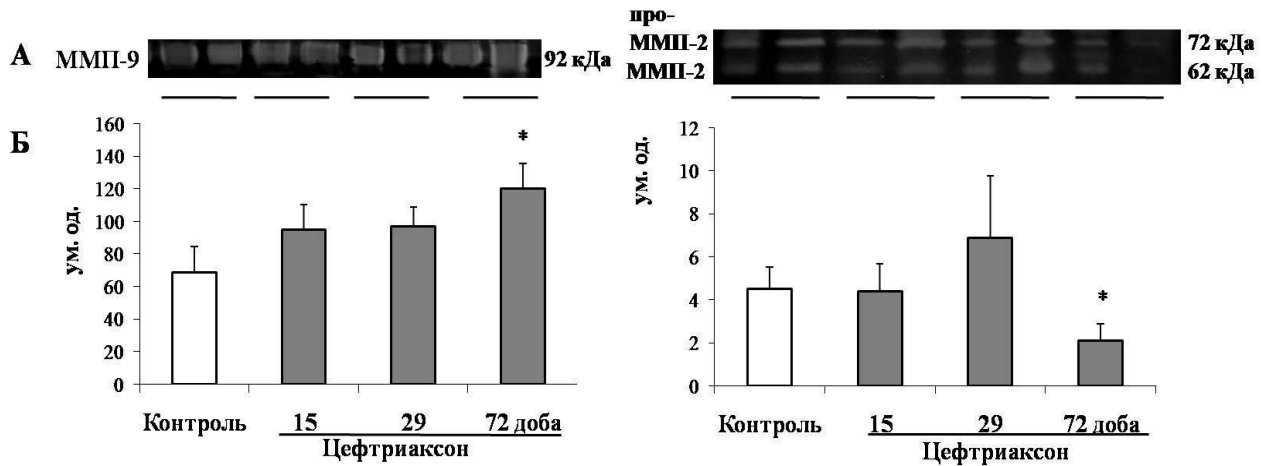


Рис. 14. Желатиназна активність ММП-9 та ММП-2 в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону;  $M \pm m$ ;  $n = 16$ ; А – електрофореграма після детекції активності ММП, Б – результати денситометрії; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

**Ступінь сприйнятливості щурів до розвитку експериментального коліту у віддалені терміни після введення цефтриаксону.** Для підтвердження порушення бар'єрної функції товстої кишки у віддалені терміни після антибіотикотерапії ми визначили рівень проникності епітелію та транслокації бактерій у системний кровотік. На 72 добу експерименту спостерігалось вірогідне ( $p < 0,05$ ) підвищення проникності епітелію товстої кишки, яке визначали за кількістю фарби Еванса, транслокованої із просвіту кишки в кров (рис. 15А). Це також супроводжувалось збільшенням кількості мікроорганізмів у крові щурів у 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 15Б).

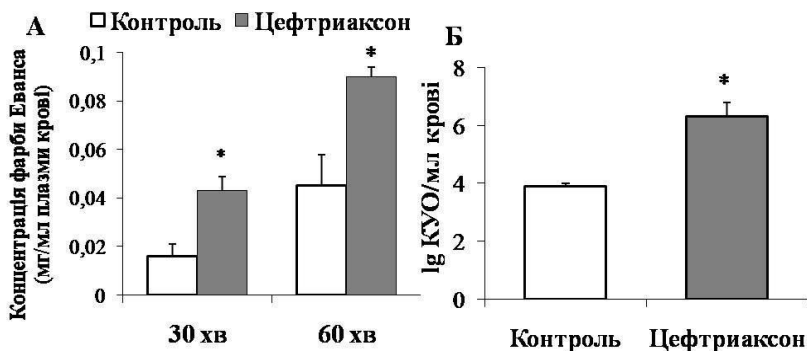


Рис. 15. Проникність епітелію товстої кишки (А) та загальна кількість мікроорганізмів (lg КУО/мл) у крові щурів (Б) на 72 добу від початку введення цефтриаксону;  $M \pm m$ ;  $n=16$ ; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

Оскільки порушення кишкового бар'єру з наступною транслокацією бактерій вважається одним із основних факторів патогенезу ЗЗК [Kaser, 2011], ми припустили, що вищенаведені зміни підвищуватимуть чутливість до дії ульцерогенних чинників. Для підтвердження даного припущення, у щурів, яким попередньо вводили цефтриаксон, на 72 добу експерименту було викликано експериментальний коліт. Встановлено, що введення цефтриаксону посилює набряк товстої кишки, що проявлялось збільшенням її маси в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) у

порівнянні з групою коліту. Підвищена сприйнятливості до експериментального коліту виникала на тлі цефтриаксон-індукованої гіпертрофії келихоподібних клітин та дегрануляції тучних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів. Крім того, у щурів з експериментальним колітом, після попереднього введення цефтриаксону, концентрація запальних цитокінів ФНП- $\alpha$  та ІЛ-10 в сироватці крові була вищою в 1,3 раза ( $p = 0,05$ ) порівняно з групою коліту (рис. 16).

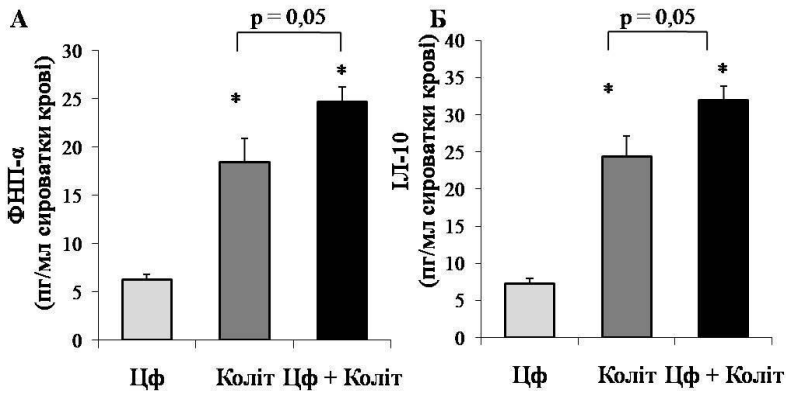


Рис. 16. Концентрація ФНП- $\alpha$  (А) та ІЛ-10 (Б) у сироватці крові щурів з експериментальним колітом, індукованим введенням 3% йодоацетаміду на 72 добу від початку введення цефтриаксону; Цф – цефтриаксон; Коліт – 3% йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год;  $M \pm m$ ;  $n = 15$ .

Отже, зрушення кишкового гомеостазу за умов антибіотикотерапії підвищують сприйнятливості до експериментального коліту.

## ВИСНОВКИ

Вперше встановлено, що цефтриаксон-викликані зміни вмісту КЛЖК та КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів супроводжуються тривалими зрушеннями в окисно-антиоксидантному балансі слизової оболонки товстої кишки, активацією редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, Nf- $\kappa$ B та призводять до тривалих змін у складі глікопротеїнів слизу, і, як результат, підвищення чутливості кишкового бар'єру до ульцерогенних чинників.

1. Показано, що введення цефтриаксону (300 мг/кг, 14 днів) призводило до зниження загального вмісту КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів; найбільш суттєво знижувався вміст пропіонової і масляної кислот, що призводило до зростання відносного вмісту оцтової кислоти, яка має прозапальні властивості. Ці зміни були стійкими в часі та супроводжувалися зниженням анаеробного індексу.
2. Встановлено, що введення цефтриаксону щурам впродовж 14 днів зменшувало рівень FFA2 та FFA3 рецепторів у слизовій оболонці товстої кишки; знижувалась імунореактивність SMCT1 транспортера КЛЖК на апікальній мембрані та підвищувалась – MCT1 і MCT4 транспортерів на базолатеральній мембрані ентероцитів.
3. Короткотривале введення цефтриаксону впродовж 5 днів викликало активацію редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Збільшення терміну введення цефтриаксону до 14 днів

асоціювалось з порушенням окисно-антиоксидантного балансу, підвищенням рівня гіпоксія-чутливого транскрипційного фактору NF1 $\alpha$ , фосфорилування ERK1/2 та пригніченням фосфорилування p38 MAP-кіназ.

4. Зниження загальної концентрації глікопротеїнів, а також гексоз, фукози та підвищення сіалових кислот поверхневого слизу товстої кишки щурів спостерігалось лише у віддалені терміни після 14-добового введення цефтриаксону (на 72 добу експерименту), що свідчить про передчасне термінування олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнів слизу. Ці зміни супроводжувались посиленням активності прозапальної матриксної металопротеїнази ММП-9 та зниженням антизапальної – ММП-2 в слизовій оболонці товстої кишки щурів.
5. Доведено, що введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводить до віддалених змін інтегративної бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки, що підтверджується: збільшенням проникності епітелію товстої кишки щурів, транслокацією бактерій у кров та підвищенням чутливості до розвитку експериментального коліту.

### СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Holota Y. The disturbance of oxidant-antioxidant balance in rat colonic mucosa after antibiotic therapy / Y. Holota, O. Tjarko, T. Dovbynchuk, G. Tolstanova // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2015. – Т. 9, №3–4. – С. 49-56. *(Здобувачем проведено пошук джерел літератури, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку).*
2. Голота Ю.В. Проникність епітелію товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтріаксону / Ю.В. Голота, А.С. Базан, Т.В. Довбинчук, Г.М. Толстанова // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2016. – Т. 76, № 4. – С. 17-21. *(Здобувачем проведено експериментальну роботу, аналіз отриманих результатів, підготовку матеріалів до друку).*
3. Holota Y.V. Carbohydrate composition of rat intestine surface mucus layer after ceftriaxone treatment / Y.V. Holota, Y.A. Olefir, T.V. Dovbynchuk, G.M. Tolstanova // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 88, N 6. – P. 35-44. *(Здобувачем проведено пошук джерел літератури, досліджено біохімічний склад слизу, аналіз отриманих результатів, підготовку матеріалів до друку).*
4. Holota Y.V. Fecal short-chain fatty acids at different time points after ceftriaxone administration in rats / Y.V. Holota, O.O. Holubenko, A.M. Ostapchuk, T.M. Serhiychuk, L.V. Zakordonets, G.M. Tolstanova // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2017. – Vol. 89, N 1. – P. 50-58. *(Здобувачем проведено планування експерименту, аналіз та статистична обробка результатів, підготовку матеріалів до друку).*
5. Голота Ю.В. Окисно-антиоксидантна рівновага в слизовій оболонці товстої кишки щурів в різні терміни після введення цефтриаксону / Ю.В. Голота, А.С. Базан, Г.М. Толстанова // Вісник Київського національного університету імені

- Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2017. – № 22. – С. 11-15. *(Здобувачем проведено пошук джерел літератури, планування та проведення експериментальної роботи, аналіз результатів, підготовку матеріалів до друку).*
6. Голота Ю.В. Метод вимірювання проникності епітелію товстої кишки щурів в різні терміни експериментального коліту / К.І. Афіцька, Т.В. Довбинчук, Ю.В. Голота, Т.М. Червінська, Г.М. Толстанова // Клінічна та експериментальна патологія. – 2015. – Т. 14, №4 (54). – С. 9-13. *(Здобувачем проведено пошук джерел літератури, аналіз отриманих результатів).*
  7. Голота Ю. Перевірка гіпотези ймовірності виникнення виразкового коліту при тривалій антибіотикотерапії / О. Головка, Ю. Голота, Т. Сергійчук, А. Путніков, Л. Закордонєць, Т. Довбинчук, Г. Толстанова // XIII Міжнародна наукова конференція молодих науковців «Шевченківська весна 2015: біологія», 1-3 квітня 2015: матер. конф. – Київ, Україна, 2015. – С. 35.
  8. Голота Ю.В. Зміни спектру коротколанцюгових жирних кислот та експресії рецепторів в товстій кишці щурів після введення цефтріаксону / Ю.В. Голота, Н.В. Дзюбенко, А.М. Остапчук, А.В. Путніков, Т.М. Сергійчук, Г.М. Толстанова // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», 23-24 квітня 2015, Київ, Україна: Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, N4. – P. 100.
  9. Голота Ю.В. Склад та метаболічний профіль мікробіоти і функціональна активність клітин товстої кишки щурів як чинники розвитку запалення внаслідок тривалої антибіотикотерапії / Ю.В. Голота, І.В. Акуленко, А.С. Курочка, О.О. Голубенко, А.М. Остапчук, А.В. Путніков, Т.В. Довбинчук, Т.М. Сергійчук, І.М. Варенюк, Г.М. Толстанова // Науково-практична конференція «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань», 4-6 вересня 2015: матер. конф. – Київ, Україна, 2015. – С. 19.
  10. Holota Y. Long-term effect of antibiotic therapy on colonic levels of short-chain fatty acids (SCFA), FFA2 and FFA3 receptors / Y. Holota, N. Dzyubenko, A. Ostapchuk, T. Dovbynychuk, T. Serhiychuk, A. Putnikov, I. Kaji, G. Tolstanova // The 15<sup>th</sup> International Conference of Ulcer Research, October 1–4, 2015: abstract book. – Ottawa, Canada, 2015. – P. 48.
  11. Holota Y.V. Effect of antibiotic therapy on commensal microbiota, production, sensing and transporting of short-chain fatty acids (SCFA) in the rats colon / Y.V. Holota, O.O. Holubenko, A.M. Ostapchuk, N.V. Dzyubenko, T.V. Dovbynychuk, A.V. Putnikov, T.M. Serhiychuk, I. Kaji, G.M. Tolstanova // II International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21<sup>st</sup> century”, April 14-15, 2016: abstract book. – Kyiv, Ukraine, 2016. – P. 22.
  12. Голота Ю. Вплив цефтріаксону на продукцію слизу келихоподібними клітинами слизової оболонки кишечника / Я. Олефір, Ю. Голота, Т. Довбинчук, Н. Рослова, І. Варенюк, М. Дзержинський, Т. Сергійчук,

- Г. Толстанова // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 19-21 квітня 2016: матер. конф. – Львів, Україна, 2016. – С. 305-306.
13. Голота Ю. Оксидативні порушення в слизовій оболонці товстої кишки щурів за умов антибіотикотерапії / А. Базан, Ю. Голота, Т. Червінська, Г. Толстанова // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 19-21 квітня 2016: матер. конф. – Львів, Україна, 2016. – С. 23-24.
14. Holota Y. The correlation between microbiota metabolic activity & mucosal homeostasis after ceftriaxone treatment / Y. Holota, A. Bazan, Y. Olefir, N. Dzyubenko, A. Ostapchuk, T. Dovbynychuk, T. Chervinska, T. Serhiychuk, A. Putnikov, I. Kaji, G. Tolstanova // Early Career Physiologists' Symposium (ECPS 2016), July 28, 2016: abstract book. – Dublin, Ireland, 2016. – P. 53-54.
15. Holota Y. The correlation between microbiota metabolic activity & mucosal homeostasis after ceftriaxone treatment / Y. Holota, A. Bazan, Y. Olefir, N. Dzyubenko, A. Ostapchuk, T. Dovbynychuk, T. Chervinska, T. Serhiychuk, A. Putnikov, I. Kaji, G. Tolstanova // Physiology 2016, July 29-31, 2016: abstract book. – Dublin, Ireland, 2016. – P. 124-125.
16. Holota Y. Oxidative disturbance of the rats colonic mucosa after antibiotic therapy / Y. Holota, A. Bazan, T. Dovbynychuk, T. Chervinska, G. Tolstanova // 9<sup>th</sup> International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (ISCTICO), September 15-17, 2016: abstract book. – Cracow, Poland, 2016. – P. 43-44.

## АНОТАЦІЯ

**Голота Ю.В. Біохімічні показники стану кишкового бар'єру у віддалені терміни після введення цефтриаксону. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена вивченню взаємозв'язку між метаболічною активністю мікробіоти та біохімічними показниками інтегративної цілісності кишкового бар'єру у віддалені терміни після введення антибіотика цефтриаксону. Вперше встановлено, що введення антибіотика цефалоспоринового ряду цефтриаксону (300 мг/кг, 14 діб) призводить до стійкого в часі зниження вмісту КЛЖК, що асоціюється зі змінами імунореактивності та рівнів FFA2, FFA3 рецепторів та МСТ1, МСТ4, SMCT1 транспортерів КЛЖК в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Це супроводжується підвищенням вмісту ТБК-активних сполук та дисбалансом активності ферментів антиоксидантного захисту в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Порушення окисно-антиоксидантного балансу призводить до зниження вмісту SH-груп білків та, відповідно, активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1 HIF1 $\alpha$  і пов'язаних з ними

ERK1/2 MAP-кіназ. Це провокує зміни вуглеводного складу глікопротеїнів слизу товстої кишки щурів, посилення активності прозапальної матриксної металопротеїнази ММП-9 і, як результат, підвищення проникності епітелію та чутливості до ульцерогенних чинників у віддалені терміни після введення цефтриаксону. Таким чином, порушення бар'єрної функції товстої кишки є основним фактором віддалених наслідків антибіотикотерапії, що підвищує сприйнятливність до розвитку запалення.

**Ключові слова:** антибіотики, коротколанцюгові жирні кислоти, окисно-антиоксидантний баланс, редокс-чутливі транскрипційні фактори, глікопротеїни слизу.

## АННОТАЦІЯ

**Голота Ю.В. Биохимические показатели состояния кишечного барьера в отдаленные сроки после введения цефтриаксона. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертационная работа посвящена изучению взаимосвязи между метаболической активностью микробиоты и биохимическими показателями интегративной целостности кишечного барьера в отдаленные сроки после введения антибиотика цефтриаксона. Впервые установлено, что введение антибиотика цефалоспоринового ряда цефтриаксона (300 мг/кг, 14 дней) приводит к устойчивому во времени снижению содержания КЛЖК, что ассоциируется с изменениями иммунореактивности и уровней FFA2, FFA3 рецепторов и MCT1, MCT4, SMCT1 транспортеров КЛЖК в слизистой оболочке толстой кишки крыс. Это сопровождается повышением содержания ТБК-активных соединений и дисбалансом активности ферментов антиоксидантной защиты в слизистой оболочке толстой кишки крыс. Нарушение окислительно-антиоксидантного баланса приводит к снижению содержания SH-групп белков и, соответственно, активации редокс-чувствительных транскрипционных факторов Egr-1, Sp-1, NIF1 $\alpha$  и связанных с ними ERK1/2 MAP-киназ, что провоцирует изменения углеводного состава гликопротеинов слизи толстой кишки крыс, усиление активности провоспалительной матриксной металопротеиназы ММП-9 способствуя повышению проницаемости эпителия и чувствительности к ульцерогенным факторам в отдаленные сроки после введения цефтриаксона. Нарушения барьерной функции толстой кишки является основным фактором отдаленных последствий антибиотикотерапии и увеличивает восприимчивость к развитию воспаления.

**Ключевые слова:** антибиотики, короткоцепочечные жирные кислоты, окислительно-антиоксидантный баланс, редокс-чувствительные транскрипционные факторы, гликопротеины слизи.

## SUMMARY

### **Holota Y.V. Biochemical features of intestinal barrier long-term after ceftriaxone administration. – Manuscript.**

Dissertation for the candidate of biological sciences degree by speciality 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

The study is dedicated to the investigation of the interconnection between metabolic activity of microbiota and biochemical indicators of the intestinal barrier integrity long-term after antibiotic ceftriaxone administration.

The administration of the cephalosporin antibiotic ceftriaxone (300 mg/kg, 14 days) induced the stable downregulation of SCFAs level with preponderance of acetate and loss of propionate and butyrate. These changes were associated with decrease immunoreactivity of the FFA2 and FFA3 receptors in rats' colon mucosa. Ceftriaxone administration decreased the immunoreactivity for SMCT1 transporters of SCFA on the brush border of enterocytes, however increased the immunoreactivity for MCT1 & MCT4 transporters on the basolateral membrane of enterocytes. Even in 56 days after antibiotic withdrawal (the 72<sup>nd</sup> day of the experiment) levels of SCFAs and FFA3 were still below control value. These changes evoked a significant shift in colonic mucosal homeostasis. We found increased level of TBA-active substances, decreased the activity of SOD and catalase antioxidant enzymes after ceftriaxone injection. The disturbance of oxidant-antioxidant balance induced reduction of protein SH-groups and activation of redox-sensitive transcription factors Egr-1, Sp-1, HIF1 $\alpha$  and ERK1/2 MAP kinase.

Consequently, these changes provoked colonic mucus barrier dysfunction long-term after the antibiotic withdrawal (the 72<sup>nd</sup> day of the experiment). The total concentration of mucus glycoproteins was decreased. Moreover, we found changes in the glycosylation of mucins. Levels of hexoses and fucose were decreased, while sialation of mucus glycoproteins was increased. Similar mucosal glycosylation alterations occur during IBD development. These changes were accompanied by increased activity of proinflammatory matrix metalloproteinase MMP-9 and decreased anti-inflammatory MMP-2 in rats colon mucosa. Mucus barrier defects at the 72<sup>nd</sup> day of the experiment were associated with increased permeability of colon epithelium measured by Evans blue permeation method. In addition, we found increased bacterial translocation to the blood. Intestinal barrier disruption long-term after the ceftriaxone withdrawal (the 72<sup>nd</sup> day of the experiment) was associated with enhanced sensitivity of rats to the iodoacetamide-induced colitis. This was manifested by an increase in the colon wet weight and an increase in the serum levels of inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-10.

Thus, the disruption of colon barrier function is a significant long-term side-effect of antibiotic therapy, which increases susceptibility to the development of intestinal inflammation.

**Keywords:** antibiotics, short chain fatty acids, oxidant-antioxidant balance, redox-sensitive transcription factors, mucus glycoproteins.