

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ДОВБИНЧУК ТАЇСА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 612.362/.364:577.181.5+615.33

МЕХАНІЗМ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ ГРУПИ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ НА
ТРАНСПОРТ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ
КИШКИ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Толстанова Ганна Миколаївна

Київ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Етіопатогенез антибіотикасоційованої діареї	12
1.1.1. Епідеміологія антибіотикасоційованих діарей.....	12
1.1.2. Механізми розвитку антибіотикасоційованої діареї.....	13
1.2. Загальна характеристика антибіотиків ряду цефалоспоринів.....	15
1.2.1. Цефтріаксон – антибіотик III покоління цефалоспоринового ряду.....	18
1.3. Транспортна функція епітелію товстої кишки.....	20
1.3.1. Механізми транспорту води через епітелій товстої кишки... ..	20
1.3.2. Механізми транспорту Na^+ через епітелій товстої кишки: електронейтральне та електрогенне всмоктування.....	22
1.3.3. Транспорт Cl^- через епітелій товстої кишки: електрогенне та електронейтральне всмоктування та секреція.....	23
1.3.4. Механізми секреції K^+ через епітелій товстої кишки.....	25
1.3.5. Транспорт HCO_3^- через епітелій товстої кишки.....	25
1.4. Вплив антибіотиків на транспортну функцію епітелію.....	26
1.5. Роль тучних клітин в регуляції транспортної функції епітелію товстої кишки.....	28
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	32
2.1. Об'єкт дослідження.....	32
2.2. Схеми експериментів	32
2.4. Визначення транспортної функції епітелію товстої кишки, методом перфузії ізольованої ділянки <i>in situ</i>	34
2.4.1. Перфузія ізольованої ділянки товстої кишки <i>in situ</i>	34
2.4.2. Визначення сумарного потоку води.....	35
2.4.3. Визначення сумарного потоку Na^+ та K^+	36

2.4.4. Визначення сумарного потоку СГ.....	37
2.5. Гістологічний аналіз товстої кишки.....	38
2.5.1. Морфометричний аналіз гістологічних зрізів.....	38
2.5.2. Цитохімічне визначення тучних клітин.....	38
2.6. Вестерн-блот аналіз.....	39
2.7. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією.....	40
2.8. Визначення секретії слизу.....	41
2.9. Статистична обробка отриманих результатів.....	42
РОЗДІЛ 3. СУМАРНИЙ ПОТІК ВОДИ, Na⁺, K⁺ ТА СГ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКІВ	43
3.1. Дослідження впливу цефтріаксону на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	43
3.1.1. Дослідження впливу 5-добового введення цефтріаксону на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	43
3.1.2. Дослідження впливу 14-добового введення цефтріаксону на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	47
3.2. Дослідження впливу цефіксиму на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	50
3.3. Дослідження впливу азитроміцину на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	52
РОЗДІЛ 4. МЕХАНІЗМИ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ НА ТРАНСПОРТНУ ФУНКЦІЮ ЕПІТЕЛІЮ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ.....	56
4.1. Дослідження ролі іонних транспортерів та аквапоринового транспорту в механізмах дії антибіотиків на транспортну функцію товстої кишки.....	56
4.1.1. Експресія транспортерів йоннів в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону....	56

4.1.2. Роль аквапоринових каналів AQP8 в механізмах антибіотикасоційваної діареї після введення цефтріаксону та азитроміцину.....	60
4.2. Рівень секреції слизу в товстій кишці щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону.....	65
4.3. Роль гістаміну в механізмах антибіотик-викликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки.....	67
4.3.1 Морфометричний аналіз гістологічних зрізів товстої кишки щурів після введення цефтріаксону.....	68
4.3.2. Порівняльний аналіз ступеня дегрануляції тучних клітин після введення цефтріаксону та азитроміцину.....	69
4.3.3. Дослідження впливу гістаміну на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	71
4.3.4. Дослідження ролі H1-гістамінових рецепторів в механізмах цефтріаксонвикликаногої діареї у щурів.....	72
РОЗДІЛ 5. ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ ПРОБІОТИКІВ В ПОПЕРЕДЖЕНІ ПОРУШЕНЬ ТРАНСПОРТУ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКІВ.....	77
5.1. Вплив мультипробіотика на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	77
5.2. Вплив сахароміцета на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів.....	82
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	89
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	109

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ААД – антибіотикасоційована діарея

цАМФ – циклічний аденозин монофосфат

ШКТ – шлунково–кишковий тракт

AQP – аквапоринові канали

CFTR – трансмембранний регулятор муковісцидозу

DRA – Cl⁻/OH⁻ обмінник

ENaC – епітеліальний Na⁺ канал

NHE – Na⁺/H⁺ обмінник

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

КЛЖК - коротколанцюгові жирні кислоти

ПЗП – пеніцилін-зв'язуючі протеїни

цГМФ – циклічний гуанозин-монофосфат

ВСТУП

Актуальність теми. Товста кишка є важливим фізіологічним бар'єром на шляху виникнення діареї. Її всмоктувальна здатність у людини сягає 6 л води за добу і, лише, у випадку її підвищеного надходження виникає діарея [1]. Всмоктування води через епітелій товстої кишки відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється транспортом електролітів, переважно Cl^- та Na^+ , парацелюлярно через міжклітинні проміжки. Також, часткове всмоктування відбувається трансцелюлярно за допомогою аквапоринових каналів мембрани колоноцитів [2]. Всмоктувальна функція кишечника знаходиться у тісному взаємозв'язку з життєдіяльністю кишкової мікробіоти. Зрушення в її складі впливають на рівень колонізаційної резистентності та є причиною розвитку місцевого запального процесу, це може призводити до змін у всмоктувальній функції кишечника [3]. Встановлено прямий ефект окремих пробіотичних штамів, зокрема біфідобактерій та лактобактерій, на секреторну функцію кишечника та експресію іонних транспортерів [4-5].

Одним з найчастіших симптомів, пов'язаних з прийомом антибіотиків, є розвиток діареї. Антибіотикасоційована діарея (ААД) - це як мінімум три і більше епізодів неоформленого випорожнення, які розвиваються на тлі застосування антибактеріальних препаратів чи впродовж 4-8 тижнів після їх відміни. Частота розвитку такого стану становить 5-30% [6-7]. Згідно з сучасною теорією етіопатогенезу ААД, не більше ніж 20% випадків асоційовані з інфікуванням *Clostridium difficile* [8-9]. Решта випадків має ідіопатичний характер (не виявлений конкретний збудник діареї) і залежить від механізму антибактеріальної дії різних груп антибіотиків. Так, розвиток ААД пов'язують з посиленням моторики кишечника (під дією макролідів з 14-членним лактонним кільцем); підвищенням внутрішньопросвітного осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків

(цефоперазон, цефіксим); порушенням декон'югації жовчних кислот чи змін вмісту коротколанцюгових жирних кислот, при зрушеннях у складі та метаболічній активності кишкової мікробіоти (характерно для антибіотиків широкого спектра дії: флуороквінолони, цефалоспорини, кліндаміцин тощо) [10].

Існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну функцію епітелію кишечника *in vitro*, наприклад, за умов внутрішньопросвітної перфузії ізольованої ділянки кишечника [11], інкубації культури епітеліоцитів [109] чи ізольованої ділянки кишечника [12] розчином антибіотиків. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі ААД за умов системного впливу антибіотиків не досліджувалося; не встановлені молекулярні механізми порушення транспортної функції епітелію товстої кишки за дії антибіотиків; не зрозумілим залишається питання транзиторного характеру діареї на фоні введення антибіотику.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетної теми 11БФ-03601 «Механізми реалізації адаптаційно-компесаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та гранта Президента України для обдарованої молоді «Розробка методів прогнозування та профілактики порушень в шлунково-кишковому тракті, викликаних антибактеріальною терапією» (договір № 12/2011). Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 6 від 10 грудня 2012 року.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати механізми транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків та розробити методи їх корекції.

Відповідно до мети перед нами були поставлені такі завдання:

1. Вивчити показники сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків ряду цефалоспоринів та макролідів.
2. Дослідити експресію транспортерів йонів Na^+ , Cl^- та аквапоринових каналів AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів за дії антибіотиків ряду цефалоспоринів та макролідів.
3. Визначити рівень секреції слизу в товстій кишці щурів за дії антибіотику ряду цефалоспоринів.
4. Визначити роль гістаміну та H_1 -гістамінових рецепторів в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки у щурів.
5. Провести порівняльний аналіз механізмів, що лежать в основі порушення транспортної функції епітелію товстої кишки щурів за дії антибіотиків ряду цефалоспоринів та макролідів.
6. Дослідити профілактичну дію пробіотиків в попередженні порушень транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії цефалоспорину.

Об'єкт дослідження: механізм дії антибіотиків на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки.

Предмет дослідження: сумарні потоки води та електролітів (Na^+ , K^+ , Cl^-) через епітелій товстої кишки; активність тучних клітин; секреція слизу за дії антибіотиків та їх корекція пробіотиками.

Методи дослідження. У роботі використовували фізіологічні, біохімічні, спектрофотометричні, колориметричні, молекулярні, гістологічні, цитохімічні, фармакологічні методи та методи варіаційної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі отримані принципово нові дані щодо механізмів ідіопатичної ААД, з огляду на порушення транспортної функції епітелію товстої кишки. Вперше встановлено, що порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, як механізму ААД, характерно лише для певних груп антибіотиків, зокрема

антибіотику цефалоспоринового ряду III покоління цефтріаксону. Зрушення у транспортній функції епітелію товстої кишки після внутрішньом'язового введення цефтріаксону пов'язано зі змінами в експресії йонних транспортерів (NHE3, ENaC, CFTR) та аквапоринового транспортеру AQP8. Ці показники відрізняються після короткого (5 днів) та довготривалого (14 днів) курсу введення антибіотику, що співпадає зі змінами у клінічних проявах діареї і, відповідно, може бути обґрунтуванням транзиторної природи клінічних проявів ААД.

Встановлено, що введення антибіотиків зумовлює розвиток прозапальних змін в слизовій оболонці товстої кишки. Цей ефект, принаймні частково, опосередковується через вивільнення гістаміну із тучних клітин та його взаємодії з H1-гістаміновими рецепторами.

Застосування антибіотиків супроводжується змінами секреції слизу, що призводить до порушення слизового бар'єру кишечника.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконано весь обсяг досліджень транспортної функції епітелію товстої кишки, визначення секреції слизу. В проведенні молекулярних досліджень по визначенню експресії протеїнів транспортерів допомагали м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М. та н.с., к.б.н. Драніцина А.С. Доцент, к.б.н. Варенюк І.М. та н.с., к.б.н. Линчак О.В. надавали консультативну допомогу при проведенні гістологічних та цитохімічних досліджень. Мультипробіотик був наданий д.б.н., проф. Янковським Д.С. (НВК «О.Д. Пролісок»). Самостійно проведене статистичне опрацювання одержаних результатів, підібрана та проаналізована література за темою дисертації. В обговоренні результатів дослідження брали участь співавтори наукових публікацій, зокрема, окрему подяку висловлюю проф., д.б.н. Т.В. Береговій та к.м.н. Закордонець Л.В. Планування напрямків досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків здійснено за участю наукового керівника.

Практичне значення одержаних результатів. В роботі експериментально доведена доцільність сумісного застосування

мультипробіотика («Симбітер[®] ацидофільний» концентрований) чи пробіотика небактеріальної природи на основі *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) (Ентерол[®] 250) на фоні антибіотикотерапії, для попередження порушень транспортної функції епітелію товстої кишки і, відповідно, клінічних проявів ААД.

Встановлено, що блокада H1-гістамінових рецепторів попереджає антибіотиквикликані порушення транспортної функції епітелію товстої кишки. Це дозволяє рекомендувати застосування антигістамінних препаратів, зокрема блокатора H1-гістамінових рецепторів лоратадину (Кларитин[®]), не лише для запобігання алергічних реакцій, які часто супроводжують прийом антибіотиків, але й для попередження розвитку діареї.

Матеріали дисертації включені до спецкурсів «Фізіологія травлення та харчування» та «Фізіологічна фармакологія» на кафедрі фізіології людини і тварин Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а також можуть бути рекомендовані до включення у спецкурси медико-біологічних вищих навчальних закладів.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: VIII Міжнародній конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012), United European Gastroenterology Education “Basic Science Course: Epithelial ion transport in the GI tract (Шеген, Угорщина, 2012), II Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body” (Київ, 2012), 20th United European Gastroenterology Week (Амстердам, Нідерланди 2012), IX Міжнародній конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології». – (Львів, 2013), 7th International Conference “Probiotics, prebiotics and new foods” (Рим, Італія, 2013), Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті» (Київ, 2014), 8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Будапешт, Угорщина 2014), XI Український

біохімічний конгрес (Київ, 2014), Bukovinian International Medical Congress (Чернівці, 2015), Науково-практична конференція «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (Київ, 2015).

Публікації За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, що відбивають основний зміст дисертаційної роботи: 7 статей у наукових виданнях, з них 5 в рекомендованих ДАК України і 11 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, методів досліджень, розділу з викладенням отриманих результатів, розділу, присвяченому аналізу й узагальненню результатів, висновків та списку літератури, який складається з 206 найменувань. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 132 сторінках (з яких основна частина займає 108 сторінки), ілюстрована 3 таблицями, 3 мікрофотографіями та 27 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіопатогенез антибіотикасоційованої діареї

1.1.1. Епідеміологія антибіотикасоційованої діареї

Сучасну медицину не уявити без прийому різних антибактеріальних препаратів. Антибіотики є одним із провідних класів лікарських засобів у боротьбі з бактеріальними інфекціями. Їх відкриття радикально змінило можливості сучасної медицини. На сьогоднішній день у медицині використовують декілька десятків антибіотиків різних груп: β -лактамази (пеніциліни, цефалоспорини), макроліди (еритроміцин, олеандоміцин, азитроміцин), аміноглікозиди (линкоміцин, клиндаміцин), тетрацикліни та інші [13, 14]. Антибактеріальна терапія займає значне місце у лікуванні хворих всіх вікових категорій і посідає друге місце за частотою призначень. Однак до призначення антибіотиків потрібно підходити з обачністю, пам'ятаючи про розвиток багаточисельних побічних реакцій, однією з яких є антибіотикасоційована діарея (ААД). Антибіотикасоційована діарея – це, як мінімум, три і більше епізодів неоформленого випорожнення, які розвиваються на тлі застосування антибактеріальних препаратів чи впродовж 4-8 тижнів після їх відміни. Частота розвитку такого стану становить 5 - 30% [15]. ААД може розвиватися незалежно від шляху введення антибіотиків (пероральне, парентеральне і, навіть, трансвагінальне). На сьогодні виділяють два типи ААД: 1) діарея зумовлена мікроорганізмом *Clostridium difficile* (*C. difficile*), яка складає близько 20 % усіх випадків [16, 33]; 2) решта 80 % - це ідіопатична діарея, тобто нез'ясованої етіології.

ААД може розвиватися за участі різних механізмів та проявляти себе через широкий діапазон клінічних ознак та симптомів [16]. ААД може

проходити від легкого до важкого ступеня. Практично будь-який антибіотик може бути причетний до виникнення ААД, навіть, короткі курси антибіотиків та профілактика перед операцією [17]. Для профілактики ААД, важливо зрозуміти, патофізіологію та фактори ризику її розвитку.

1.1.2. Механізми розвитку антибіотикасоційованої діареї

Діарея викликана *C. difficile*. Нормобіота товстої кишки являє собою складну екосистему мікроорганізмів, яка відіграє ключову роль у гомеостазі ШКТ [18, 19]. Глобальні зміни в складі і кількості мікробіоти кишечника (навіть за відсутності розростання патогенних мікроорганізмів) можуть призвести до ААД [23, 107-108].

C. difficile – анаеробна спороутворююча грампозитивна бактерія, яка вперше була описана в 1935 р. [22, 27]. Вміст *C. difficile* у нормальній мікробіоти кишечника – 0,01-0,001%. У здорових осіб частота висівання *C. difficile* становить 3-6%. Спори *C. difficile* резистентні до стандартних дезінфікуючих засобів і можуть перебувати в аеробних умовах до 3 років. Вегетативні форми *C. difficile* продукують токсин А, який пошкоджує стінку кишечника; цитотоксин (токсин В), який має виражені цитопатогенні властивості; та бінарний токсин [9, 24, 27, 28]. Токсин А стимулює гуанілатциклазу, підвищує секрецію рідини у просвіт кишечника, що сприяє розвитку діареї. Токсин В проявляє цитопатогенну дію через інгібування білкового синтезу й пошкодження мембрани ентеро- і колоноцитів, стимулює апоптоз епітеліальних клітин шляхом впливу на АТФ-залежні калієві канали мітохондрій, що супроводжується втратою клітинами йонів калію та електролітними зрушеннями [29-32].

Є три ключові чинники розвитку цієї інфекції: застосування антибіотиків [24], похилий вік [25] і госпіталізація [26]. *C. difficile* розповсюджується легко від пацієнта до пацієнта. Таким чином, початкові

спалахи можуть швидко розвиватися і в інших пацієнтів, якщо не дотримуються санітарних норм.

Надмірний ріст бактерії *C. difficile*, може призвести до значних ускладнень, таких як паралітична кишкова непрохідність, дилатація і перфорація товстої кишки [20-22].

Ідіопатична діарея. Патогенез ідіопатичної ААД (не виявлений конкретний збудник діареї) може залежати від механізму антибактеріальної дії різних груп антибіотиків. Так, розвиток ААД пов'язують із: посиленням моторики кишечника (макроліди з 14-членним лактонним кільцем); підвищенням внутрішньопросвітного осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків (цефоперазон, цефіксим); підвищенням активності секреторної функції кишечника у відповідь на порушення декон'югації жовчних кислот чи змін вмісту коротколанцюгових жирних кислот, зі зрушенням у складі та метаболічній активності кишкової мікробіоти (характерно для антибіотиків широкого спектра дії: флуороквінолони, цефалоспорини, кліндаміцин тощо) [16]. Бактерії товстої кишки, особливо деякі анаероби, метаболізують вуглеводи, як джерело енергії, що виробляють молочну кислоту і коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), причому останні легко поглинаються товстою кишкою [34-36]. Втрата цих бактерій внаслідок лікування антибіотиками може призвести до збільшення кількості вуглеводів у просвіті ободової кишки, що призводить до осмотичної діареї.

Одним із механізмів діареї за дії різних груп лікарських препаратів є прямий вплив на всмоктувальну функцію епітелію кишечника. Так, бісакодил - чи мізопростолвикликана діарея зумовлені активацією аденілатциклази ентероцитів з наступною стимуляцією активної секреції йонів Cl^- , HCO_3^- , пасивного відтоку Na^+ , K^+ та води. Блокада АТФази дігоксином, ауранофіном, колхіцином чи олсалазіном викликає діарею через пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази [37]. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі ААД, з огляду на

механізм дії різних груп антибіотиків, не досліджувалося, хоча існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну функцію епітелію [11-12, 38].

1.2. Загальна характеристика антибіотиків ряду цефалоспоринів

Протягом тисячоліть людство страждало інфекційними захворюваннями, які були основною причиною смерті мільйонів людей. Тільки в 1928 році англійський мікробіолог А. Флемінг відкрив перший антибіотик і почався новий період у біології і медицині – ера антибіотиків [99].

Антибіотики – група органічних речовин природного чи напівсинтетичного походження, які руйнують чи уповільнюють ріст бактерій, грибів та пухлин. В наш час відомі тисячі антибіотиків, але лише деякі з них відносно безпечні для застосування в клінічній практиці [100].

Великим досягненням 60-х років було відкриття нової групи антибіотиків цефалоспоринів, виділених з культури цвілевих грибів *Cephalosporium acremonium*, які за складом близькі до пеніциліну, але стійкі до β -лактамаз і активні проти грампозитивних та грамнегативних бактерій. Родина цефалоспоринів налічує близько 60 препаратів [101].

Цефалоспорини містять ядро 7-аміноцефалоспоринової кислоти, яке складається з лактамного кільця сплавленого з шестичленним дегідротіазиним замість п'ятичленного тiazолідинового кільця пеніцилінів.

Цефалоспорини зв'язуються з ферментами бактерій, які беруть участь в утворенні клітинної стінки і, таким чином, справляють бактерицидну дію. Антибіотики цефалоспоринової групи проникають крізь пори клітинної стінки бактерій та взаємодіють з пеніцилін-зв'язуючими протеїнами (ПЗП) і пригнічують їх активність. ПЗП – це ферменти, які відповідають за синтез

пептидоглікану, основного елементу клітинної стінки бактерії. В результаті взаємодії з ПЗП порушується зшивка нових ланцюгів пептидоглікану і зменшується жорсткість клітинної стінки, що призводить до лізису бактерій під дією високого внутрішньоклітинного осмотичного тиску [102].

Існує декілька класифікацій цефалоспоринів. В їх основу покладено мікробіологічні і фармакологічні аспекти. Найчастіше використовується класифікація, згідно з якою цефалоспорини діляться на покоління або генерації відповідно до спектру їх антибіотичної дії, тому препарати II, III та IV поколінь не замінюють антибіотики I покоління і використовуються при різних інфекціях [102] (табл. 1.1).

Таблиця. 1.1.

Класифікація цефалоспоринів

I покоління	II покоління	III покоління	IV покоління
Парентеральні			
Цефалотин Цефазолин	Цефуроксим Цефамандол Цефокситин Цефотетан	Цефотаксим Цефтріаксон Цефтазидим Цефоперазон Цефоперазон/сульбактан	Цефепим Цефпиром
Пероральні			
Цефалексин Цефадроксил	Цефаклор Цефуроксим аксетил	Цефіксим Цефтибутен	

Антибіотики I покоління мають високу активність проти грампозитивних коків, а саме *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, коагулазонегативні стафілококи, β -гемолітичні стрептококи, пневмококи. Цефалоспорини I покоління не активні проти ентерококів, наприклад, *Enterococcus faecalis* - колишній *Staphylococcus faecalis*.

При парентеральному введенні цефалоспорины I покоління добре проникають у різні органи і тканини. Пероральні цефалоспорины цього покоління застосовують при стрептококових тонзилофарингітах.

Антибіотики II покоління мають високу антибактеріальну дію проти грамнегативних бактерій групи ентеробактерій (*Escherichia coli*, протей, клебсієлла, ентеробактер тощо), також на *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*. Цефалоспорины цього покоління не активні проти ентерококів (наприклад, *Enterococcus faecalis*), більшості анаеробів, метицилін-резистентних стафілококів і *Pseudomonas*. Цефалоспорины цієї групи майже завжди резистентні до утворюючих β -лактамази і до деяких хромосомальних β -лактамаз. [103, 105].

Цефалоспорины III покоління діють на синьогнійну паличку та *Acinetobacter*. Окремі цефалоспорины резистентні до β -лактамаз грамнегативних бактерій. Більшість препаратів III покоління мають деяку активність *in vitro* відповідно до *Bacteroides fragilis* і *Pseudomonas*. Цефиксим і цефподоксим, пероральні цефалоспорины III покоління, неактивні проти більшості штамів *Enterobacter* і *Pseudomonas* і мають обмежену активність *in vitro* до анаеробних бактерій. Цефиксим також неактивний проти більшості стафілококів. Цефалоспорины III покоління не діють на метицилін-резистентні стафілококи і, зазвичай, ентерококи (наприклад, *Enterococcus faecalis* і *Listeria monocytogenes*).

Спочатку парентеральні цефалоспорины III покоління використовувалися лише при терапії важких інфекцій в стаціонарі, проте в даний час, у зв'язку зі зростанням антибіотикорезистентності, їх нерідко застосовують і в амбулаторних умовах. При важких і змішаних інфекціях, парентеральні цефалоспорины III покоління використовують у поєднанні з аміноглікозидами II-III поколінь, метронідазолом, ванкомицином.

Цефтріаксон не слід використовувати при інфекціях жовчовивідних шляхів, так як він може випадати у вигляді солей жовчі. Також препарат не слід застосовувати новонародженим, зважаючи на можливість витіснення

білірубін у зв'язку з альбумінами плазми і ризику розвитку ядерної жовтяниці. У той же час, при багатьох інфекціях, пов'язаних з ентеробактеріями, парентеральне введення цефалоспоринових препаратів рекомендується як для профілактики при хірургічних втручаннях, так і для лікування хворих сепсисом біліарного походження.

На відміну від парентеральних, пероральні цефалоспоринові препарати III покоління застосовують при інфекціях, викликаних грамнегативною флорою, а також в якості другого етапу терапії.

Цеффиксим, порівняно з пероральними цефалоспориновими препаратами II покоління, більш активний проти грамнегативної флори - *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* і родини *Enterobacteriaceae*.

IV покоління – антибіотики, активні проти бактероїдів та інших анаеробів. Вони мають дуже виражену стабільність до дії β -лактамаз бактероїдів [103].

У порівнянні з цефалоспориновими препаратами III покоління препарати IV генерації більш активні проти коків, грамнегативних бактерій родини *Enterobacteriaceae* і проти *Pseudomonas aeruginosa* (включаючи штами, резистентні до цефтазидиму).

1.2.1. Цефтріаксон – антибіотик III покоління цефалоспоринового ряду

Цефтріаксон – антибіотик широкого спектру дії, який є найбільш активним серед інших антибіотиків цефалоспоринового ряду. Близько 90% штамів ентеробактерій пригнічуються при концентрації цефтріаксону в крові 1 мг/л [104].

Бактерицидна дія цефтріаксону опосередковується через інгібування синтезу клітинної стінки бактерій. Цефтріаксон ацетилює мембранозв'язані транспептидази, порушуючи, таким чином, перехресне зшивання пептидогліканів, необхідне для забезпечення міцності та ригідності клітинної стінки [105].

Після внутрішньом'язового введення цефтріаксон швидко і повністю всмоктується. Цефтріаксон зв'язується з альбумінами плазми (85% - 95%). Препарат довго зберігається в організмі. Мінімальні антимікробні концентрації препарату виявляються в крові протягом 24 годин і більше. Легко проникає в органи, рідини організму (перитоніальну, плевральну, синовіальну, при запаленні мозкових оболонок – у спинномозкову), в кісткову тканину. [106].

Цефтріаксон призначають для лікування інфекційних захворювань, викликаних чутливими до нього мікроорганізмами, а саме: інфекції ЛОР-органів, верхніх і нижніх дихальних шляхів (гострий і хронічний бронхіт, пневмонія, абсцес легенів, емпієма плеври); інфекції шкіри та м'яких тканин (у тому числі стрептодермії); інфекції сечостатевого органу (пієліт, гострий та хронічний пієлонефрит, цистит, простатит, епідедеміт, гінекологічні інфекції, неускладнена гонорея); інфекції органів черевної порожнини (жовчних шляхів і шлунково-кишкового тракту, перитоніт); сепсис та бактеріальна септицемія; інфекції кісток (остеомиєліт) та суглобів; бактеріальний менінгіт і ендокардит; м'яка шанкра, сифіліс, хвороба Лайма (спірохетоз); тифозна лихоманка; сальмонельоз. Також цефтріаксон призначається при інфекціях, що розвиваються на фоні ослабленого імунітету, а також для профілактики після-операційних гнійно-септичних ускладнень [106].

Цефтріаксон відносно добре переноситься, хоча, в окремих випадках, можливий розвиток побічних ефектів з боку травної системи (нудота, блювання, діарея, транзиторне підвищення активності печінкових трансаміназ, холестатична жовтяниця, гепатит, псевдомембранозний коліт), у вигляді алергічних реакцій (шкірний висип, свербіж, еозинофілія, рідко – набряк Квінке), системи згортання крові (гіпопротромбінемія), сечовидільної системи (інтерстиціальний нефрит).

1.3. Транспортна функція епітелію товстої кишки

1.3.1. Механізми транспорту води через епітелій товстої кишки

Переміщення води в просвіт та з просвіту ШКТ відбувається пасивно, за осмотичним градієнтом, який створюється за рахунок активного транспорту електролітів, переважно йонів хлору та натрію за двома шляхами: парацелюлярно (через міжклітинні проміжки) та трансцелюлярно за допомогою спеціальних каналів, вбудованих в апікальну та базолатеральну мембрани, що носять назву аквапорини (AQP) [1]. Йонний транспорт контролює абсорбцію та секрецію води. Після потрапляння хімуса в дванадцятипалу кишку вода з плазми крові надходить через слизову оболонку в просвіт кишки, створюючи там ізотонічне середовище, яке зберігається по всій довжині кишечника. По мірі просування хімуса в нижні відділи ШКТ змінюється його електролітний склад.

Всмоктувальна здатність товстої кишки сягає 6 л, а з калом виділяється біля 100 мл/добу [40], і лише у випадку її підвищеного надходження виникає діарея [1]. Парацелюлярний транспорт води в товстої кишки відбувається за рахунок генерації гіпертонічного абсорбенту, що створює гідравлічний вакуум, який сприяє всмоктуванню води з фекалій. Це більш характерно для крипт дистального відділу товстої кишки на відміну від проксимальних відділів кишечника [1, 39].

Частково всмоктування відбувається трансцелюлярно, за допомогою аквапоринових каналів. Аквапорини вперше були виявлені у 1991 році [41-42]. Вони являють собою групу невеликих мембранних білків, які забезпечують різним епітеліальним тканинам проникність для води. Усього родина аквапоринів налічує щонайменше 13 членів, з яких більшість проявляють чітку специфічність до тканин [43-45]. У ШКТ аквапорини мають широке розповсюдження. Так AQP0, AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10, AQP11, AQP12, локалізовані в епітеліальних

клітинах по всій довжині травної трубки та клітинах травних залоз [44, 46-48], в клітинах крові та головному мозку [49-54].

За даними літератури [49, 52, 55], для всіх аквапоринів, незалежно від їх типу, характерна єдина будова та однаковий спосіб розміщення в бішаровій фосфоліпідній мембрані. Всі вони є білками, які утворюють гомотетрамери. Їх мономери представлені 6 поліпептидними ланцюжками, або внутрішньомембранними α -спіральними доменами, що складаються приблизно з 270 амінокислот. Вони 6 разів пронизують плазматичну мембрану, утворюючи три позаклітинні (A, C і E) і дві внутрішньоклітинні (B і D) петлі, при цьому NH₂- і C- кінцеві фрагменти містяться в цитоплазмі. Цитоплазматична петля B представлена NPA-мотивом (аланін-пролін-аспарагін в залишках 76, 77 і 78 відповідно), а позаклітинна петля E представлена таким же NPA-мотивом (аланін-пролін-аспарагін в залишках 192-194). Ці дві петлі відіграють ключову роль в утворенні водного каналу, так як вони здатні занурюватися в товщу мембрани. Завдяки цьому кожен мономер утворює одну водну пору, через яку вода здатна переміщуватися в обох напрямках. Інакше кажучи, один аквапорин, або тетрамер здатний утворювати 4 водних канали.

Аквапорини 3-го, 4-го та 8-го типів (AQP3, AQP4, AQP8) були виявлені в слизовій оболонці товстої кишки, а аквапорин 1-го типу (AQP1) виділений з підслизової оболонки ендотеліальних клітин [56].

AQP3 знаходиться на базолатеральній мембрані стовбурових епітеліальних клітин, а AQP4 - на базолатеральній мембрані в'їчастого епітелію товстої кишки [57-58]. У мишей з дефіцитом AQP4 на 50% була зменшена осмотична проникність для води в товстій кишці, в той час як відсутність AQP3 не справляла значних змін у транспорті води кишечником [59]. При цьому була виявлена потужна роль саме AQP8 у забезпеченні всмоктування води у товстій кишці за нормальних умов та на тлі запальних процесів (виразкового коліту, хвороби Крона тощо) [60].

1.3.2. Механізми транспорту Na^+ через епітелій товстої кишки: електронейтральне та електрогенне всмоктування.

У висхідному (проксимальному) відділі товстої кишки переважає електронейтральна абсорбція натрію, а у її низхідному (дистальному) відділі – електрогенна [61-62]. Потрібно зазначити, що існує певна видоспецифічна залежність у співвідношенні електронейтральної та електрогенної абсорбції. Так у товстій кишці кролів переважає електрогенна абсорбція, а у щурів – електронейтральна [63]. Що стосується людини та миші, дані обмежені.

Електрогенна абсорбція Na^+ . Електрогенна абсорбція Na^+ відбувається через епітеліальні Na^+ -канали (ENaC), які локалізовані на апікальній мембрані епітеліальних клітин товстої кишки. Ці канали є високоселективними для Na^+ в порівнянні з K^+ , мають доволі невелику одноканальну провідність і лінійну вольтамперну взаємодію. Їх активність пригнічується амilorидом та іншими діуретичними компонентами, тому вони названі амilorид-чутливими ENaC [64].

Na^+ надходить у клітину кишечника з просвіту за допомогою білка, який знаходиться на базолатеральній мембрані Na^+ , K^+ насосу, за осмотичним градієнтом. Роль ENaC в механізмах діареї вивчена недостатньо [65]. Активність ENaC регулюється не лише різними гормонами, але й внутрішньоклітинними факторами. Транспорт Na^+ через ENaC регулюється за механізмом так званого «негативного зворотного зв'язку», коли Na^+ спричиняє негативний вплив на діяльність ENaC. Зміни внутрішньоклітинної концентрації Na^+ при абсорбції NaCl можуть пригнічувати ENaC провідність. Цей механізм негативного зворотного зв'язку, контролює всмоктування Na^+ а, отже, абсорбції NaCl. Інгибування «негативного зворотного зв'язку» ENaC може допомогти пошуку нових методів лікування діареї.

На сьогодні однозначно не визначено кількісне співвідношення абсорбції електролітів, що забезпечується цими каналами. Основною рушійною силою поглинання Na^+ цими каналами є електрохімічний градієнт

для Na^+ і негативна різниця потенціалів на клітинній мембрані. Абсорбція Na^+ супроводжується протитоком йонів Cl^- через CFTR Cl^- -канали, які локалізовані на апікальній мембрані, а також через парацелюлярні шунти [66].

Електронеутральна абсорбція Na^+ . Основний транспорт NaCl в епітелії товстої кишки відбувається за рахунок електронеутральної абсорбції через паралельні Na^+/H^+ та $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмінники. Їх роботою керує Na^+/K^+ -АТФаза. Для абсорбції 3 молекул NaCl необхідно гідролізувати одну молекулу АТФ [67].

В епітелії товстої кишки існує три типи Na^+/H^+ обмінників (NHE) [63]. Встановлено, що Na^+/H^+ обмінники локалізовані як в клітинах поверхневого епітелію, так і в криптах. Перший тип Na^+/H^+ обмінника був виявлений на базолатеральній мембрані, і він не має відношення до абсорбції Na^+ . Na^+/H^+ обмінники другого (NHE2) та третього (NHE3) типів були виявлені на апікальній мембрані епітеліальних клітин товстої кишки. Особливо великий вплив на абсорбцію Na^+ має NHE3 обмінник. Регуляція NHE2 і NHE3 відрізняється в проксимальному і дистальному відділах товстої кишки, так же, як і експресія цих обмінників: підвищується за рахунок виснаження Na^+ в проксимальному і зменшується в дистальному [68]. В епітеліальних клітинах крипт щура був ідентифікований новий тип Na^+/H^+ обмінника, який функціонально пов'язаний з Cl^- -каналом (CFTR), а не з $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмінником [69].

1.3.3. Транспорт Cl^- через епітелій товстої кишки (електрогенне та електронеутральне всмоктування та секреція).

Концентрація хлору в клітині складає біля 30 ммоль/л, але в просвіті кишки вона менша. Cl^- виходить із клітини пасивно. На сьогодні описано 3 хлорних обмінника в епітеліальних клітинах товстої кишки: зокрема $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмінник, локалізований на базолатеральній мембрані (аніонний

обмінник I і II типу (AE1/2) і два обмінника апікальної мембрани: $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмінник, представлений у вигляді AE1 і Cl^-/OH^- обмінник – у вигляді білку названого **DRA**, кількість якого зменшується в аденомах товстої кишки [70]. Показано, що **DRA** - білок також виконує функцію транспортера для SO_4^{2-} . Цікаво, що кількість **DRA** підвищується у мишей з відсутніми **NHE3**, але в звичайних умовах вона не залежить від виснаження Na^+ , в той час, як **AE1** пригнічується альдостероном [71]. Мутація в гені, що кодує **DRA** у людини, є причиною вродженої хлоридної діареї та Пендред синдрому (синдром вродженої глухоти). На основі даних, отриманих на субмандибулярній і панкреатичній протоках, за якими обмін $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ регулювався **CFTR** Cl^- каналами, припускають, що обмін $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ в епітелії товстої кишки, так само як і Na^+/H^+ , контролюється **CFTR** Cl^- каналами [72].

Хлорний канал на апікальній мембрані секреторних клітин кишечника – **CFTR**-білок (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Це трансмембранний регулятор, що супроводжує муковісцидоз. Цей білок локалізується в клітинах підшлункової залози, кишечника, дихальних шляхів, статевих органів. При вродженому захворюванні муковісцидозі виявлена мутація гена, який кодує саме цей білок, і цей процес призводить до порушення секреції Cl^- . Тобто, порушення транспорту Cl^- може бути прямим наслідком дисфункції **CFTR** Cl^- -канала. Найбільш часта мутація – це втрата фенілаланіну в положенні 508. Вона призводить до утворення дуже довгого ланцюга білку, який не може вбудуватись у клітинну мембрану [73].

В секреторних клітинах кишечника **CFTR** являється єдиним хлорним каналом, у той час як у секреторних клітинах інших тканин (дихальні шляхи, слинні залози) є ще і Ca^{2+} -залежний Cl^- -канал в апікальній ділянці мембрани. Тому, у хворих на муковісцидоз епітелій кишечника не здатний секретувати Cl^- [69].

1.3.4. Механізми секреції K^+ через епітелій товстої кишки

Концентрація K^+ в товстій кишці складає 80 ммоль/л за рахунок активної секреції йону K і від'ємного електричного потенціалу в просвіті кишки, яка здатна і до пасивної секреції K^+ . Активне поглинання K^+ відбувається в дистальному відділу товстої кишки щурів, кролика та мурчаків [74-75]. Воно забезпечується H^+-K^+ -АТФазами, які експресуються на поверхні епітеліальних клітин та в криптах. Ці АТФази розрізняються за їх чутливістю до оубаїну та онепразолу [67]. Обидва типи H^+-K^+ -АТФаз були знайдені в поверхневому епітелії, а в апікальній мембрані клітин крипт товстої кишки - лише оубаїн-чутлива ізоформа H^+-K^+ -АТФази. В епітеліальних клітинах K^+ накопичується в цитозолі переважно через транспортні білки Na^+-K^+ -АТФази, H^+-K^+ -АТФази та $Na^+-2Cl^- -K^+$ котранспортер. Кишкова H^+-K^+ -АТФаза входить до родини Р-типу АТФаз, які є подібними до Na^+-K^+ -АТФази та до гастральної H^+-K^+ -АТФази, що містить α - (НКс α) і β - субодиниці (НКс β , NaК β 3). Експресія НКс α і NaК β підвищується при нестачі Na^+ і виснаженні K^+ , відповідно, або альдостероном. Найцікавішим є те, що люмінальна оубаїн-чутлива H^+-K^+ -АТФаза може функціонувати поперемінно і як Na^+-K^+ -АТФаза. Отже, K^+ потрапляє всередину клітини із просвіту товстого кишечника через 2 різні H^+-K^+ -АТФази апікальної мембрани епітелію товстої кишки. K^+ транспортується через базолатеральну мембрану завдяки кільком різним механізмам, до яких належать базолатеральні цАМФ- і Ca^{2+} -активовані K^+ -канали та КСІ ко-транспортер КСС1 [76].

1.3.5. Транспорт HCO_3^- через епітелій товстої кишки

Секреція HCO_3^- має велике значення в транспорті рідини. Транспорт HCO_3^- в товстій кишці має електрогенні і електронейтральні компоненти. Електронейтральна секреція HCO_3^- опосередковується через апікальний

аніонний канал - Cl/HCO_3^- обмінник. В літературі описано 3 типи Cl/HCO_3^- обмінників, один знаходиться на базолатеральній мембрані, два інших - на апікальній [70, 72]. Cl/HCO_3^- обмін відбувається через базолатеральну мембрану епітеліальних клітин товстої кишки завдяки експресії двох ізоформ Cl/HCO_3^- обмінників (AE1 та AE2) [77-78]. На апікальній мембрані Cl/HCO_3^- обмінника локалізована AE1 ізоформа та Cl/OH^- обмінник, що кодується геном білку DRA (Down-Regulated in Adenoma) [70, 72, 79]. Електрогенні канали CFTR також беруть участь в транспорті HCO_3^- [78]. Вважається, що саме CFTR є посередником електрогенного компоненту транспорту HCO_3^- [77, 80]. Електрогенна секреція HCO_3^- активується та збільшується через активацію внутрішньоклітинних цАМФ, цГМФ або концентрацію Ca^{2+} [81]. Було показано, що ентеротоксин кишкової палички стимулює секрецію HCO_3^- дванадцятипалої кишки через цГМФ. Потужні інгібітори електронейтрального і електрогенного компонентів транспорту HCO_3^- може стати корисним доповненням до лікування діареї.

Таким чином, різнонаправлені процеси абсорбції та секреції в товстій кишці визначають сумарний транспорт рідини в ній. Вода рухається за осмотичним градієнтом, який створюється транспортом розчинених речовин, переважно, електролітів. Тому, підвищення секреції чи порушення абсорбції електролітів лежить в основі таких симптомів, як діарея та закріп.

1.4. Вплив антибіотиків на транспортну функцію епітелію

Незважаючи на те, що збільшення осмотичного тиску в просвіті кишки, активна секреція, ексудація та зміни в моторній активності можуть

спричинювати діарею, порушення транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки залишається ключовим її чинником. Діарея, за дії інфекційних мікроорганізмів, може бути обумовлено, як збільшенням секреції рідини і електролітів, так і зменшенням всмоктування, або тим та іншим [79].

Згідно ранніх досліджень антибіотики мають пряму дію на транспорт рідини через епітелій кишечника [11, 12, 109]. Перфузія кишки антибіотиком групи лінкозамідів кліндамицином помітно пригнічувала всмоктування води та призводила до секреції в умовах *in vivo* в досліджах на клубовій, тощій та товстій кишках. Автори не змогли розкрити механізм кліндаміциновикликаних порушень транспортної функції епітелію проте показали, що цАМФ або цГМФ збільшували проникність слизових оболонок та не впливали на морфологію слизової оболонки [12]. Дослідження впливу антибіотиків групи лінкозамідів, кліндамицину і лінкоміцину; групи макролідів еритроміцину; групи аміноглікозидів гентаміцину; бета-лактамного антибіотику ампіциліну; і глікопептидного антибіотику ванкоміцину на транспорту іонів через епітелій дистального відділу товстої кишки кроля встановили їх різнонаправлений вплив. Кліндаміцин, еритроміцин, гентаміцин і лінкоміцин пригнічували відповідь епітелію та електростимуляцію. Кліндаміцин і лінкоміцин знижували базальний активний ток йонів через епітелій та епітеліальну відповідь на ацетилхолін. Ванкоміцин підсилював секреторну дію простагландину E₂. У той час як ампіцилін не впливав на транспортну функцію епітелію [79]. Дослідження на культурі епітеліальних клітин товстої кишки людини показали пряму дію двох пептидних антибіотиків, дураміцину і Ro 09-0198 на апікальну мембрану клітин. Антибіотики викликали збільшення транспорту іонів через підвищення регуляції електрогенних транспортерів натрію (ENaC) [13].

1.5. Роль тучних клітин в регуляції транспортної функції епітелію товстої кишки

Тучні клітини вперше були описані Р. Ehrlich в 1878 році і названі ним так, тому що в їх цитоплазмі містяться гранули з речовиною, яка зафарбовується метахроматично толуїдиновим синім. Форма та розміри тучних клітин можуть бути різні. Частіше за все вони округлої або овальної форми, містять невелике щільне ядро та зернисту цитоплазму. Різні за розміром, зокрема у людей вони сягають до 30 мкм, у гризунів від 3,5 мкм до 22 мкм [82-83]. Як відомо, тучні клітини залучені до процесів запалення в кишечнику [84], а дегрануляція тучних клітин під дією нейромедіаторів та цитокінів є маркером запального процесу [85]. Під час дегрануляції тучних клітин, окрім інших медіаторів запалення, вивільняється гістамін [86].

Тучні клітини виникають в сполучній тканині перш за все внаслідок трансформації великих та середніх лімфоцитів, макрофагів, фібробластоподібних клітин. Вони локалізовані по ходу кровоносних судин та в серозних оболонках різних органів. Ймовірно, вони не здатні самостійно синтезувати гістамін, а накопичують його з крові [87].

Існує три підтипи тучних клітин, які розрізняються за їх гістохімічними властивостями, типами грануло-асоційованих протеогліканів, вмістом нейрональних протеаз і типом цитокінів [88]. До цих підтипів належать: типові сполучнотканинні тучні клітини, які головним чином залучені в патологічні процеси в легенях і шкірі; атипові слизові тучні клітини, які переважають в жовчному міхурі та ШКТ; мозкові тучні клітини, що мають властивості двох попередніх підтипів.

В тучних клітинах гістамін знаходиться у зв'язаному стані з гепарином і зберігається в гранулах. У фізіологічних умовах невеликі кількості гістаміну постійно вивільняються в тканинах та органах, беручи участь у нейрогуморальній регуляції капілярного кровообігу, в проникності стінок

капілярів та клітинних мембран, у підтриманні тонуусу органів з гладенькою мускулатурою [89]. Однак в умовах дії багатьох факторів (висока та низька температури, отруйні речовини, больові подразнення, проникаюча радіація, мікробні токсини) має місце вивільнення великої кількості гістаміну, і він перетворюється на фактор патологічного значення [90].

Вважається, що для активації тучних клітин повинна відбутися взаємодія лужних груп молекул лібератора з комплементарними по відношенню до них, негативно зарядженими групами поверхні клітин. Вивільнення гістаміну з тучних клітин при взаємодії антигена з IgE- та IgM-антитілами на їх поверхні відбувається лише в присутності Ca^{2+} і супроводжується входом Ca^{2+} в клітину. Циклічний АМФ (цАМФ) справляє модулюючу дію на процес вивільнення гістаміну. Він може як обмежувати проникнення Ca^{2+} в клітину, так і додатково діяти на більш пізню стадію вивільнення гістаміну [89].

В товстій кишці основним депо гістаміну є саме тучні, а не ECL-клітини [90]. На сьогодні встановлено, що в кишечнику локалізовані чотири типи гістамінових рецепторів (ГР): H_1 , H_2 , H_3 та H_4 , що підтверджує важливу роль гістаміну в регуляції його функцій [90].

McCabe та Smith [91] провели ряд дослідів *in vitro* на препаратах низхідного відділу ободової кишки кроля. В результаті цих досліджень було показано, що гістамін, взаємодіючи з H_1 -ГР, справляє стимулюючий вплив на секрецію Cl^- і K^+ та на абсорбцію Na^+ .

В дослідях на ободовій кишці свині показано, що в проксимальній її ділянці гістамін справляє стимулюючий вплив на секрецію Cl^- , взаємодіючи безпосередньо з H_2 -ГР епітеліальних клітин, а не з H_1 - чи H_3 -ГР [92]. Дослідження, проведені на препараті дистальної ділянки ободової кишки свині показали, що гістамін збільшував секрецію Cl^- та Na^+ , впливаючи на H_1 -ГР епітеліальних клітин [93].

В експериментах на препараті проксимального відділу товстої кишки собак показано, що гістамін стимулює секрецію хлору через взаємодію з H_1 -

ГР, що локалізовані в ентеральній нервовій системі, та H_1 - і H_2 -ГР епітеліальних клітин слизової оболонки кишки. Збудження епітеліальних H_2 -ГР, а не H_1 -ГР викликає збільшення абсорбції Na^+ . Автори заперечують роль H_3 -ГР в регуляції транспорту солей та води в проксимальному відділі товстої кишки собак [94].

Групою дослідників під керівництвом Cooke (1995) [95] було проведено дослідження ролі H_2 - та H_3 -ГР в транспорті електролітів у дистальному відділі ободової кишки мурчаків. Було показано, що активація H_2 -ГР стимулює секрецію хлору, та не впливає на транспорт Na^+ через $EnaC$. Дія дімапріту (агоніст H_2 -ГР) була заблокована антагоністами нікотинових і мускаринових рецепторів та VIP-антагоністами і залежала від синтезу простагландинів [96]. Також авторами показано, що гістамін справляє гальмівний вплив на секрецію СГ через H_3 -ГР [95].

В дослідях на сегменті ободової кишки миші показано, що саме блокатори H_1 -ГР, а не H_2 -ГР гальмували секрецію СГ [97].

За даними Keely та співавт. [98] гістамін стимулює хлорну секрецію, взаємодіючи лише з H_1 -ГР ободової кишки людини. H_2 - та H_3 -ГР не беруть участі в цьому процесі.

Відносно ролі H_4 -ГР в регуляції транспорту води та електролітів в товстій кишці дані відсутні.

Узагальнюючи наведені літературні данні, можна припустити, що застосування антибіотиків має прямий вплив на транспортну функцію епітелію товстої кишки *in vitro*. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі ААД за умов системного впливу антибіотиків не досліджувалося; не встановлені молекулярні механізми порушення транспортної функції епітелію товстої кишки за дії антибіотиків; не

зрозумілим залишається питання транзиторного характеру діареї на фоні введення антибіотику.

Відповідям на поставлені питання була присвячена дана дисертаційна робота.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження

Дослідження проводили на білих лабораторних щурах-самцях масою 180-250 г, n=160. Тварин утримували у віварії Навчально-наукового центру “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка за стандартних умов температурного режиму (21 °С), освітлення (12/12 год), вологості та раціону харчування (повноцінний корм для лабораторних тварин К – 12-4, „Різан-1”, Україна), згідно “Стандартні правила по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)”.

Експерименти проводили згідно з етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики [110], міжнародним угодам, національному законодавству у цій галузі [111-112].

2.2. Схема експериментів

Для вивчення залучення транспортної функції епітелію товстої кишки до механізмів ААД були проведені наступні серії дослідів:

1 серія — контрольна, щурам впродовж 5 (n=25) чи 14 (n=15) днів внутрішньом'язово вводили 0,1 мл води для ін'єкцій;

2 серія — щурам впродовж 5 днів вводили антибіотик цефтріаксон (“Артеріум”, ПАТ “Київмедпрепарат”, Україна) в дозі 50 (n=14) чи 300 мг/кг (n=7) (в.м.);

3 серія — щурам впродовж 14 днів (n=14) вводили антибіотик цефтріаксон в дозі 50 (n=7) чи 300 мг/кг (n=5) (в.м.);

4 серія – тваринам вводили антибіотик цефалоспоринового ряду III покоління цефіксим (Орхид Кемикалс енд Фармасьютикалс Лтд, Індія) в дозі 10 мг/кг перорально (*per os*) впродовж 7 (n=6);

5 серія – тваринам вводили антибіотик ряду макролідів азитроміцин (ТОВ «Пліва Хорватія», Загреб Хорватія) впродовж 5 днів в дозі 15 мг/кг, перорально (*per os*) (n=6);

Для встановлення ролі гістаміну та H1 – гістамінових рецепторів в механізмах цефтріаксонвикликаної діареї проводили наступні серії дослідів:

6 серія – тваринам вводили гістамін (Sigma-Aldrich, № H7125, Німеччина) інтраперитонеально в дозах 1,8 (n=3); 3,6 (n=3); 7,2 (n=7) мг/кг, чи внутрішньовенно в дозі 3,6 мг/кг/год (n=7) через годину від початку перфузії, дані виражали, як значення сумарних потоків за 20 хв;

7 серія – тваринам вводили блокатор H1-гістамінових рецепторів лоратадин (Шерінг-Плау Лабо Н.В., Бельгія/Schering-Plough Labo NV, Belgium) в дозі 1,7 мг/кг (n=3), перорально (*per os*) впродовж 5 днів;

8 серія – вводили лоратадин 1,7 мг/кг, *per os* одночасно з цефтріаксоном 50 мг/кг (n=5), внутрішньом'язово, впродовж 5 днів.

Для визначення ролі мікрофлори в порушенні транспортної функції епітелію товстої кишки за дії антибіотику цефтріаксону проводили наступні серії дослідів:

9 серія – тваринам вводили *per os* мультипробіотик «Симбітер®» ацидофільний концентрований в дозі $1,6 \times 10^9$ КУО/кг, протягом 5 (n=9) чи 14 (n=6) днів. Мультипробіотик (ТОВ фірма "О.Д. Пролісок", Україна), що містить біомасу живих клітин у вигляді «живої» (неліофілізованої) форми з симбіотичною асоціацією 14-24 штамів найбільш фізіологічних для людини бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9 у флаконі;

10 серія – щурам даної групи впродовж 5 (n=6) чи 14 (n=6) днів *per os* вводили мультипробіотик в дозі $1,6 \times 10^9$ КУО/кг за 15 хв до введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.);

11 серія – тваринам вводили *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) (Ентерол® 250, Biocodex, Франція) в дозі 10 мг/добу протягом 5 (n=7) та 14 (n=11) днів. Одне саше містить: ліофілізовані клітини *S. boulardii*, 250 мг та допоміжні речовини: лактоза моногідрат, фруктоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, смакова добавка «тутті фрукті»;

12 серія – впродовж 5 (n=8) чи 14 днів (n=6) вводили *S. boulardii* за 15 хв до введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.).

Відповідно на 6-й, 8-й та 15-й день після початку експерименту (першим днем експерименту вважали день початку введення антибіотику) проводили визначення сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки методом перфузії ізольованої ділянки кишки *in situ*.

Щоденно, у всіх групах досліджуваних тварин, проводили *моніторинг клінічних параметрів стану щурів*. Зокрема визначали масу тіла, млявість (0-3 бали: 0 - норма, 1 – помірно піднята шерсть, 2 – тварина брудна, зменшення спонтанних рухів, 3 – тварина майже не рухається, не реагує на інших тварин) та клінічні прояви діареї (визначали за м'якістю випорожнення).

2.4. Визначення транспортної функції епітелію товстої кишки, методом перфузії ізольованої ділянки *in situ*

2.4.1 Перфузія ізольованої ділянки товстої кишки *in situ*

Тварин наркотизували уретаном (“Sigma Chemical Co”, США), з розрахунку 1,15 г/кг (внутрішньоочеревинно). Сталу температуру тіла щурів (37°C) підтримували за допомогою грілки. Для попередження респіраторної недостатності виконували трахеотомію. Після цього відкривали черевну

порожнину (лапаротомія), підтягували товсту кишку, накладали першу лігатуру на межі переходу сліпої у висхідну частину ободової кишки та робили надріз кишки і вводили привідний катетер для подачі перфузійного розчину. Через 8-10 см дистальніше від першої лігатури, накладали другу. Сегмент товстої кишки промивали теплим фізіологічним розчином та вводили вивідний катетер для збору відтікаючого (аспірованого) розчину, який фіксували другою лігатурою. Після цього закривали черевну порожнину. Привідний катетер під'єднували до багатоканального перистальтичного насоса ("Minipuls 3", Gilson®), який подавав теплий перфузійний розчин (37°C) з постійною швидкістю 0,18-0,2 мл/хв. Як перфузійний розчин використовували модифікований ізотонічний розчин Кребса-Хенселяйта (ммоль/л): NaCl – 117; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 24,8; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2; NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 5,5; рН 7,4, до якого додавали неабсорбований маркер феноловий червоний (20 мг/л).

Після 60-хвилинної перфузії (еквілібраційний період), відтікаючий розчин збирали впродовж 180 хв, через кожні 20 хв. Результати, отримані за кожний період, усереднювали. В кінці експерименту щурів умертвляли введенням летальної дози наркозу. Сегмент кишки, що перфузувався, швидко видаляли, розрізали його в повздовжньому напрямку, обережно промокували фільтрувальним папером та висушували в термостаті (60°C, 20 год), для отримання сухої маси в грамах.

2.4.2. Визначення сумарного потоку води

Для розрахунку сумарного потоку (J_{net}) води визначали концентрацію неабсорбованого маркера фенолового червоного шляхом колориметричного аналізу на спектрофотометрі (Synergy HT BioTek). Для визначення поправки на неспецифічну абсорбцію (PRC) при трьох довжинах хвиль 520, 560, 600 нм [113]. Поправку розраховували за формулою: $PRC = 560 - 1/2(520 + 600)$.

Сумарний потік води вираховували за формулою:

$$J_{\text{net води}} = \frac{v \cdot \left(1 - \frac{C_n}{C_\alpha}\right)}{W}, \text{ де}$$

$J_{\text{net води}}$ – сумарний потік води (мкл/хв·г);

v – швидкість подачі перфузату (мл/хв);

C_n – концентрація фенолового червоного в перфузійному розчині;

C_α – концентрація фенолового червоного в аспірованому розчині;

W – суха маса сегменту кишки (г).

Дані представляли у мкл/хв·г

Позитивний результат свідчить про всмоктування води, негативний – секрецію.

2.4.3. Визначення сумарного потоку Na^+ та K^+

Вимірювання концентрацій Na^+ та K^+ проводили за допомогою полум'яно-фотометричного аналізатора рідин (ПАЖ-2), що визначає концентрації йонів за інтенсивністю забарвлення кольору полум'я горіння рідини.

Для вимірювання Na^+ та K^+ за допомогою полум'яно-фотометричного аналізатора рідин аспірований розчин розводили у 600 та 20 разів відповідно, згідно методики вимірювання концентрації йонів. Для побудови калібрувальної кривої використовували показники калібрувальних розчинів NaCl та KCl різних концентрацій (0,1; 0,2; 0,3 та 0,4-нормальні) відповідно для Na^+ та K^+ .

Сумарний потік електролітів вираховували за наступною формулою:

$$J_{\text{net(йон)}} = \frac{v \cdot (S_\phi - S_\alpha)}{W} \cdot \frac{C_\phi}{C_\alpha}$$

$J_{\text{net йонів}}$ – сумарний потік йонів (мкмоль/хв·г);

v – швидкість подачі перфузату (мл/хв.);

$C\phi$ – концентрація фенолового червоного в перфузійному розчині;

$C\alpha$ – концентрація фенолового червоного в аспірованому розчині;

$S\phi$ – концентрація йона в перфузійному розчині (ммоль/л);

$S\alpha$ – концентрація йона в аспірованому розчині (ммоль/л);

W – вага сегменту кишки (г).

Дані представлені у мкмоль/хв*г. Позитивний результат свідчить про всмоктування, негативний – секрецію.

2.4.4. Визначення сумарного потоку СГ

Концентрацію йоннів СГ у перфузаті вимірювали на йонометрі (Иономер универсальный ЄВ-74) з використанням йон-селективного хлорного електроду, наповненого КСІ концентрацією 10^{-3} та індиферентного електроду з ключем, наповненим KNO_3 (10^{-2}).

Для вимірювання концентрації йоннів СГ на йонометрі, аспірований розчин розводили в 10 разів. Перед вимірюванням прилад калібрували за допомогою розчинів, виготовлених з фіксаналів КСІ («Альфарус», Україна), розведених у концентраціях 10^{-1} , 10^{-2} та 10^{-3} мМ та будували калібрувальну криву, за якою визначали концентрацію йоннів СГ. Після вимірювання кожної з проб електрод промивали дистильованою водою та висушували фільтрувальним папером.

Сумарний потік йону СГ розраховують за формулою [113-114]:

$$J_{\text{net ion}} = \frac{v \cdot (S\phi - S\alpha)}{W} \cdot \frac{C\phi}{C\alpha}$$

v – швидкість подачі перфузату (мл/хв.);

$C\phi$ – концентрація фенолового червоного в перфузійному розчині;

$C\alpha$ – концентрація фенолового червоного в аспірованому розчині;

$S\phi$ – концентрація йона в перфузійному розчині (ммоль/л);

$S\alpha$ – концентрація йона в аспірованому розчині (ммоль/л);

W – вага сегменту кишки (г).

Дані представлені у мкмоль/хв*г. Позитивний результат свідчить про всмоктування, негативний – секрецію.

2.5. Гістологічний аналіз товстої кишки

2.5.1. Морфометричний аналіз гістологічних зрізів

Ділянки товстої кишки довжиною 2 см, які видаляли на відстані 3 см від анального отвору, фіксували у 10%-му розчині формаліну, заливали у парафін за загальноприйнятою методикою, та виготовляли поперечні зрізи товщиною 5 мкм на роторному мікромомі ("Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome"). Зрізи забарвлювали гематоксиліном з дофарбуванням еозином та аналізували під мікроскопом для виявлення морфологічних змін. Для морфометричного аналізу виготовляли цифрові мікрофотографії при збільшенні у 100 та 400 разів. Використовували мікроскоп Olympus System Microscope ModelBX41 та фотокамеру Olympus Digital Camera C5050 Zoom (Японія). За допомогою комп'ютерної програми Image J вимірювали: товщину слизової оболонки, глибину крипт, висоту епітеліоцитів та площу поперечного перерізу їх ядер, площу поперечного перерізу келихоподібних клітин. Також, підраховували кількість келихоподібних клітин.

2.5.2. Цитохімічне визначення тучних клітин

Зрізи товстої кишки забарвлювали за допомогою набору для цитохімічної ідентифікації тучних клітин толуїдиновим синім (ТОВ "БиоВитрум", Росія). Забарвлення проводили згідно з протоколом фірми виробника. В тучних клітинах підраховували кількість гранул на одну клітину під імерсійним об'єктивом мікроскопа ("Olympus System Microscope

Model VX41”). У кожній експериментальній групі було проаналізовано щонайменше 100 клітин.

2.6. Вестерн блот аналіз

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували за допомогою “Dounce” гомогенізатора (“Sigma”, США) в лізуючому буфері (0,1% додецилсульфат натрію, 1% Трітон x100, 2 мкмоль/л фенол метил сульфоніл флуорид, з додаванням коктейлю інгібіторів протеїназ 16,65 мл; (“Sigma”, США) та фосфатаз (1 мкмоль ортованадат натрія) (“Sigma”, США). Концентрацію загального протеїну вимірювали за методом Бредфорда з використанням набору «Bio-Rad для білкового аналізу» (“Bio-Rad”, США). Розділення та визначення вмісту протеїнів (100 мкг загального протеїну/зразок) методом імуноблотингу проводили в 12% та 8 % SDS - поліакріламідному гелі, з наступним переносом на “Hybond-ECL” нітроцелюлозну мембрану (“Amersham Biosciences”, США), згідно зі стандартним протоколом фірми Bio-Rad. Антитіла до AQP8 (1:500; “Sigma-Aldrich”, Німеччина), CFTR (1:100; «Santa Cruz Biotechnology», Хайдельберг, Німеччина) використовували для визначення вмісту відповідних протеїнів, з наступною інкубацією з вторинними антитілами, кон’югованими з пероксидазою хрому (1:10000, “Santa-Cruz Biotech.”, США). Візуалізацію Вестерн-блот проводили ECL-реагентом (H₂O – 9 мл, тріс для 1M ECL-реагенту – 10 мл, 68 ммоль кумарової кислоти – 225 мкл, 1,2 ммоль люмінол – 500 мкл (“Amersham Biosciences”, США). Результати не менше, ніж двох різних експериментів аналізували за допомогою програми Phoretix 1D.

2.7. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

Для визначення мРНК використовували ПЛР зі зворотною транскрипцією, з використанням реагентів «Thermo Scientific» (Литва). Екстракцію РНК проводили фенольним методом. кДНК синтезували в 20 мкл реакційної суміші, яка містила: 2 мкг РНК; 1мМ дНТФ, 200 од. зворотної транскриптази; буфер для ПЛР; 20 од. рибонуклеазного інгібітору (RiboLock); 20 пкмоль зворотнього праймеру. Синтез проводився за таких умов: 65 °С – 5 хв, 45 °С – 1 год та 72 °С – 5 хв. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в 30 мкл реакційної суміші, що містила 3 мкл кДНК, буфер для ПЛР, 200 мкМ дНТФ, по 30 пмоль кожного праймера, 2,5 мМ MgCl₂, 1,5 од. Taq ДНК полімерази («Taq DNA Polymerase (recombinant)», «Thermo Scientific»).

Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за таких температурних умов: ініціююча денатурація 95°C - 3 хв, далі для 35 (28 для Actb - гена, використовуюваного як внутрішнього контролю реакції через його конститутивну експресію; 30 для Scnn1b) циклів 95°C протягом 1 хв, крок відпалу (при оптимальній температурі): CFTR (190 п.о., 53°C - 45 кроків), Slc9a3 (149 п.о., 52°C - 45 кроків), Snn1b (123 п.о., 54°C - 40 кроків) і Actb (521 п.о., 49° С - 40 кроків); розширює крок за кроком 72 °С протягом 1 хв 15 с або 1 хв (для Actb і Snn1b), або 1 хв 30 с (для Aqp8). Заклучний крок здійснюється на 72 °С протягом 5 хв.

Ген	Послідовність праймерів	
	прямий	зворотній
CFTR	actcttcttcagctggaccacacca	aaagcatcgccggagggcgt
Aqp8	cagatatgtctggggagcagacgc	cagatatgtctggggagcagacgc
Scnn1b	attccagcccctccagtac	gggtactggtggtggtggt
Slc9a3	cctgatgggcgaactgaaga	gcagtgactccccaaaaaca
Actb	tgggacgatatggagaagat	attgccgatagtgatgacct

Розділення продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1,6% агарозному гелі з 0,5xTBE буфері, при напрузі 5-10 В/см. Для напівкількісного аналізу амплікон вираження на основі денситометрії була використана програма ImageJ 1.45s. Оптико-денситометричний аналіз проводили за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення «Phoretix 1D» [115].

2.8. Визначення секреції слизу

Слиз, в основному, складається із секреторних муцинів, тому для визначення рівня секреції слизу використовували ШИК-реакцію. Для відокремлення шару мукозного гелю від поверхні товстої кишки 1 см дистального відділу товстої кишки (3 см від анального отвору) поміщали в пробірку з 2 мл 6Н N-ацетил-L-цистеїну та постійно струшували протягом 3 хв. Після цього вміст пробірки центрифугували впродовж 5 хв, 3000 RPM (T = 4C). 1 мл надосадової рідини видаляли, вміст пробірки ресуспендували та 500 мкл розчину переносили в чисті пробірки, заморожували при -20 °C. Рівень глікопротеїнів слизу вимірювали за допомогою забарвлювання PVDF (Hybond-P, Amersham International, Little Chalfont, UK) мембрани розчином перйодатної кислоти, згідно методу [116]. Спершу мембрану занурювали в 100% розчин метанолу на 2 хв, а потім у 80% розчин також на 2 хв. Після цього мембрану промивали в дистильованій воді, висушували фільтрувальним папером. 10 мкл зразку наносили на PVDF мембрану [116], яку попередньо поміщали на вологий фільтрувальний папір та витримували 10-15 хв до повного його поглинання. Мембрану промивали в дистильованій воді протягом 2 хв, після цього інкубували 10 хв в 0,5% KOH розчином в 70% етанолі і знову ополіскували в дистильованій воді. Далі мембрану занурювали в 0,5% розчин перйодатної кислоти на 10 хв, промивали

дистильованою водою і піддавали дії реагенту Шиффа (основний фуксин 1 г, 20 мл 1Н НСl, 1 г NaS₂O₅, дН₂O 200 мл) протягом 15-30 хв при постійному струшуванні. Після цього мембрану двічі інкубували в 0,6% метабісульфіт натрію впродовж 3 хв і промивали в дистильованій воді також 3 хв. Після остаточного ополіскування в дистильованій воді мембрану висушували на відкритому повітрі 10 хв та сканували за допомогою сканера (Samsung SCX-4x21). Аналіз зображень проводили вимірюванням щільності позитивно забарвлених точок за допомогою програмного забезпечення для обробки зображень Sigma Plot.

2.9. Статистична обробка отриманих результатів

Аналіз результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл даних, застосовуючи W тест Шапіро-Вілка. 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. Середні значення сумарних потоків води представлені у вигляді середнього значення ± стандартна відхилення (M±SD), n – кількість тварин у групі. Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (P) приймався рівним 0,05.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ АНТИБІОТИКІВ НА ТРАНСПОРТ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ

3.1. Дослідження впливу цефтріаксону на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

3.1.1. Дослідження впливу 5-добового введення цефтріаксону на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

Цефтріаксон, належить до III покоління антибіотиків ряду цефалоспоринів і є найбільш вживаним серед інших груп антибіотиків [117]. Встановлено, що антибіотики цефалоспоринового ряду викликають зниження рівня глутатіону та підвищення рівня продуктів перекисного окиснення ліпідів в тканині печінки [118], зумовлюють дисбіоз, асоційований зі змінами антиген-перезентувальної функції дендритних клітин кишечника та продукції ними інтерлейкінів-10 та -12 [119]. Нами встановлено, що цефтріаксон в дозі 50 мг/кг призводить до розвитку діареї в 6 % тварин на 2-й день після початку введення. На 6-й день цей показник збільшується до 12 %. На 12-й день ми спостерігали зменшення числа тварин з діареєю з 13 % до 6-7 %.

50 мг/кг – це клінічна доза для цефтріаксону. Ми прийняли до уваги той факт, що при розрахунку еквівалентної дози препаратів враховується коефіцієнт відносної поверхні тіла, для щурів він дорівнює 6. Тому наступним етапом нашої роботи була перевірка впливу цефтріаксону в дозі 300 мг/кг на клінічні прояви діареї.

Збільшення дози цефтріаксону до 300 мг/кг/добу, асоціювалося з появою м'якого стільця у 5 % тварин вже на 2-гу добу експерименту. На 3-тю добу кількість тварин з діареєю сягала 15%, до кінця досліджуваного періоду цей показник в середньому дорівнював 25-30% (рис. 3.1).

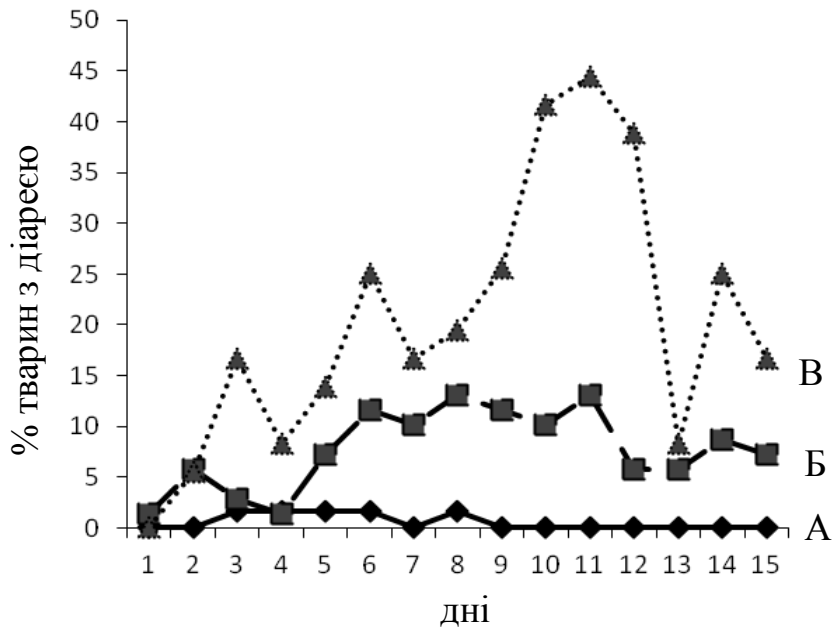


Рис. 3.1. Розвиток діареї у контрольної групи (А) щурів та на фоні введення цефтріаксону в дозах 50 мг/кг (в.м.) (Б) та 300 мг/кг (в.м.) (В).

Отже, збільшення дози цефтріаксону до 300 мг/кг викликало діарею у більшого числа тварин, проте характер її перебігу був аналогічний до дози 50 мг/кг, що свідчить про транзиторний перебіг ААД на тлі введення цефтріаксону. Далі ми перевірили наскільки клінічні прояви діареї пов'язані зі змінами у транспортній функції епітелію товстої кишки щурів за дії різних груп антибіотиків.

В результаті проведених досліджень встановлено, що 5-добове введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово) викликало вірогідні зміни у всіх вимірюваних показниках. Зокрема, введення цефтріаксону призводило до зменшення всмоктування води через епітелій товстої кишки з $36,76 \pm 27,73$ до $19,30 \pm 20,70$ мкл/хв*г ($p < 0,001$). В деяких випадках спостерігалась реверсія абсорбції на секрецію. 5-добове введення цефтріаксону призвело до статистично вірогідного зменшення всмоктування йонів натрію з $18,87 \pm 18,55$ до $13,44 \pm 12,53$ мкмоль/хв*г ($p < 0,05$). Дослідження показників сумарного транспорту йонів калію показало, що у щурів контрольної групи цей показник становив $-1,38 \pm 0,76$ мкмоль/хв*г. За

нормальних умов кожну добу в товсту кишку надходить 7 мкмоль/л калію та екскретується 9 мкмоль/л, що свідчить про секрецію даного йону, результати наших досліджень не суперечать даному факту. Сумарний потік калію після введення цефтріаксону (дослідна група) знижувався до $-1,03 \pm 0,52$ мкмоль/хв*г ($p < 0,001$). За нормальних умов спостерігається всмоктування йонів хлору в товстій кишці. В наших дослідженнях перфузія ізольованої ділянки товстої кишки щурів контрольної групи виявила позитивні значення сумарного току йонів хлору, що свідчить про його всмоктування. Сумарний потік хлору в контрольній групі становив $23,43 \pm 22,99$ мкмоль/хв*г в дослідній групі він не змінювався і дорівнював $21,25 \pm 11,27$ мкмоль/хв*г (рис. 3.2).

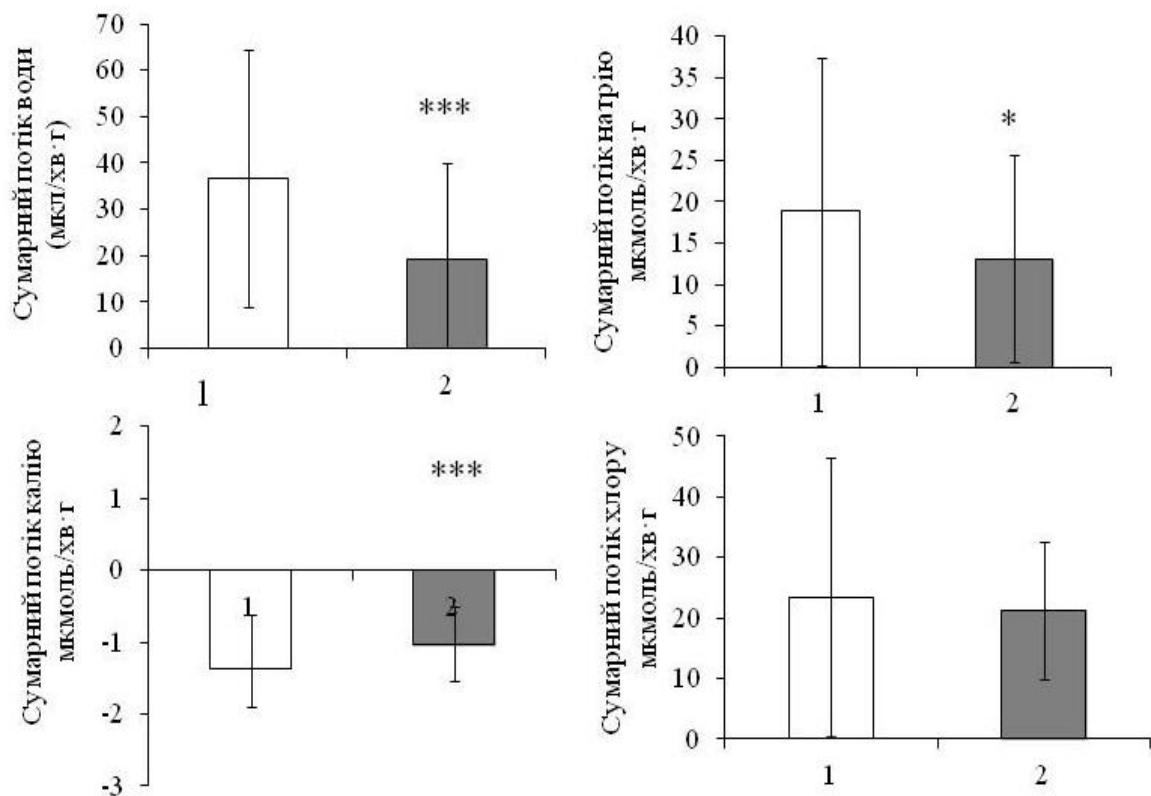


Рис. 3.2. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=19); 2 – цефтріаксон (n=14);

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Отже, 5-добове введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг призводило до статистично вірогідного зменшення всмоктування води, натрію, калію через епітелій товстої кишки щурів, що супроводжувалось клінічними проявами діареї.

За умов підвищення дози антибіотику до 300 мг/кг (в.м.) у щурів всмоктування води зменшувалося з $36,76 \pm 27,73$ до $26,54 \pm 18,85$ мкл/хв*г ($p < 0,001$), секреція калію з $-1,38 \pm 0,76$ до $-0,74 \pm 0,5$ мкмоль/хв*г ($p < 0,01$) та всмоктування хлору з $23,43 \pm 22,99$ до $19,15 \pm 13,25$ мкмоль/хв*г. Щодо йонів натрію, достовірних змін ми не спостерігали ($18,87 \pm 18,55$ – в контролі; $17,73 \pm 28,12$ – в досліді мкмоль/хв*г) (рис. 3.3).

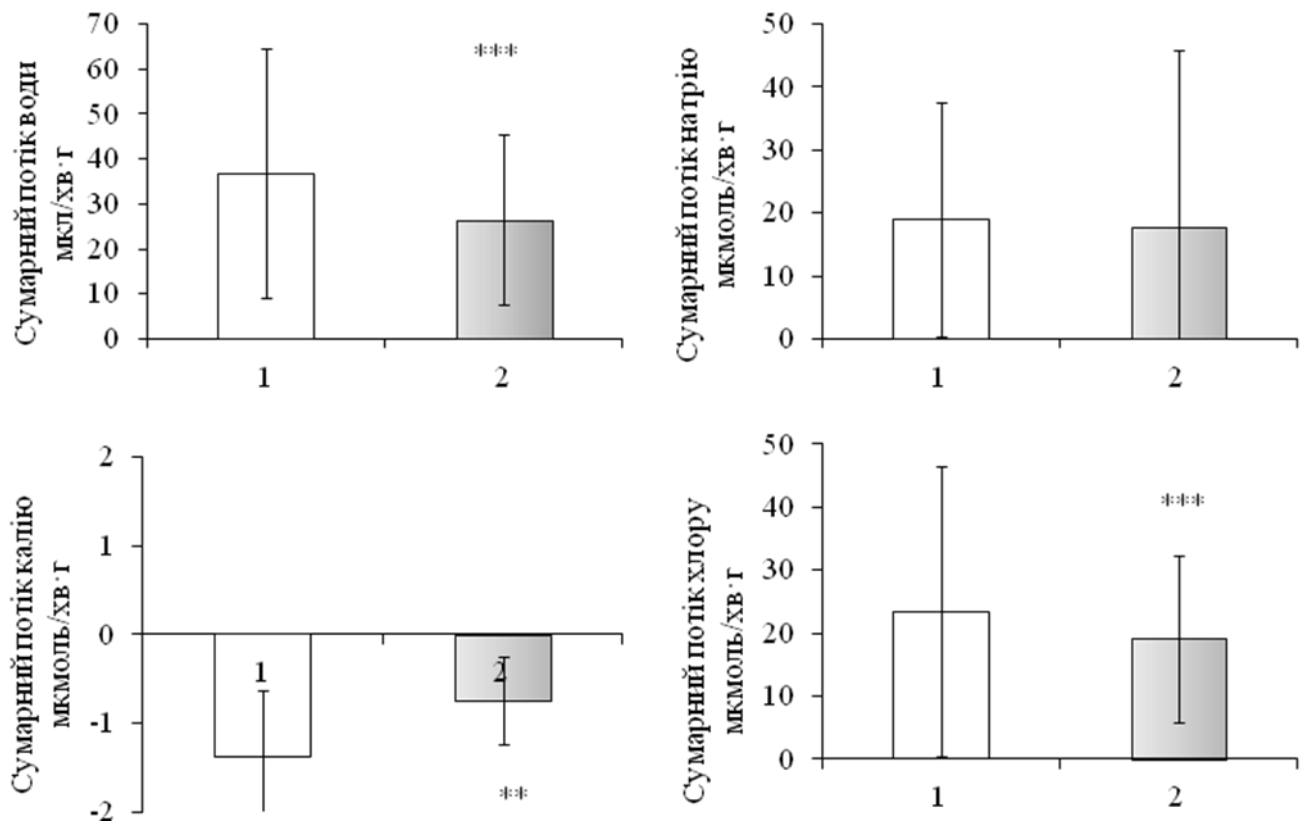


Рис. 3.3. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=19); 2 – цефтріаксон (n=7);

*** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Таким чином, спостерігались односпрямовані ефекти між дозами 50 та 300 мг/кг на транспорт води, обидві дози викликали її зменшення. Можна припустити, що введення антибіотику в високій дозі значно зрушує нормобіотний гомеостаз кишечника і, відповідно, призводить до порушення слизового бар'єру.

3.1.2. Дослідження впливу 14-добового введення цефтріаксону на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

В клінічній практиці, при лікуванні важких інфекційних захворювань, наприклад, менінгіту [120], збільшується тривалість курсу антибіотикотерапії з 5 до 14 днів. Тому наступною серією наших досліджень було вивчення змін транспортної функції епітелію після 14-добового введення цефтріаксону. Введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг впродовж 14 днів зумовлювало вірогідне зниження рівня всмоктування води: так, в контрольній групі ці показники дорівнювали $40,27 \pm 24,68$ мкл/хв*г, а в дослідній – $24,64 \pm 30,19$ мкл/хв*г ($p < 0,001$) (рис. 3.4). Збільшувалося всмоктування йонів натрію з $18,76 \pm 30,19$ до $29,97 \pm 20,02$ мкмоль/хв*г ($p < 0,001$). Статистично вірогідно зменшувалась секреція калію: з $-1,18 \pm 0,88$ мкмоль/хв*г в контрольній групі до $-0,77 \pm 0,71$ мкмоль/хв*г ($p < 0,001$) у дослідній групі. Сумарний транспорт йонів хлору через епітелій товстої кишки в контрольній групі становив $24,17 \pm 17,69$ мкмоль/хв*г. У дослідній групі 14-добове введення цефтріаксону спричинило статистично вірогідне зменшення всмоктування хлору до $17,53 \pm 15,04$ мкмоль/хв*г ($p < 0,05$).

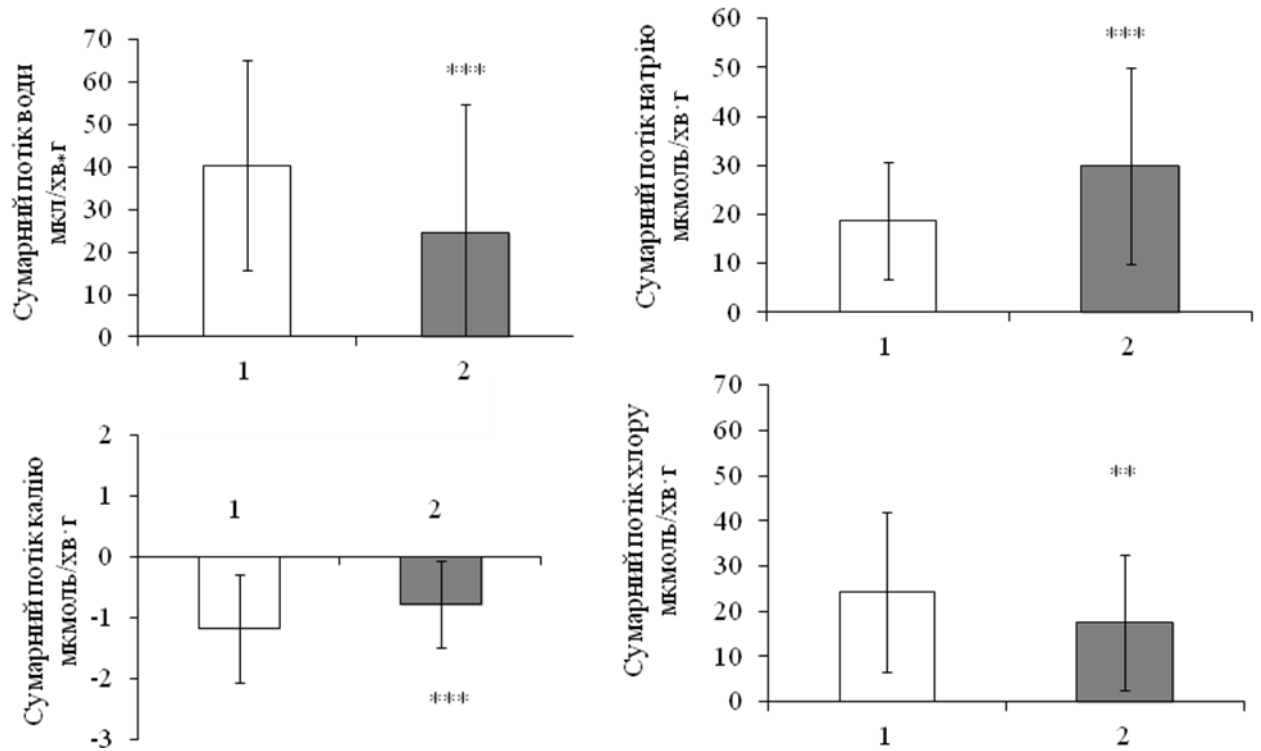


Рис. 3.4. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=9); 2 – цефтріаксон (n=7);

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Цікаво, що введення щурам цефтріаксону в дозі 300 мг/кг впродовж 14 днів збільшувало секрецію калію порівняно з контрольною групою з $-1,18 \pm 0,88$ до $-1,26 \pm 0,85$ мкмоль/хв*г ($p < 0,05$) та зменшувало сумарний потік йонів хлору з $24,17 \pm 17,29$ до $13,52 \pm 25,59$ мкмоль/хв*г ($p < 0,01$). Щодо сумарного транспорту води статистично вірогідних змін у показниках не було. Сумарний потік води (з $40,27 \pm 24,68$ до $41,85 \pm 23,24$ мкл/хв*г) та натрію (з $18,76 \pm 12,05$ до $17,92 \pm 19,14$ мкмоль/хв*г) не змінювався (рис. 3.5).

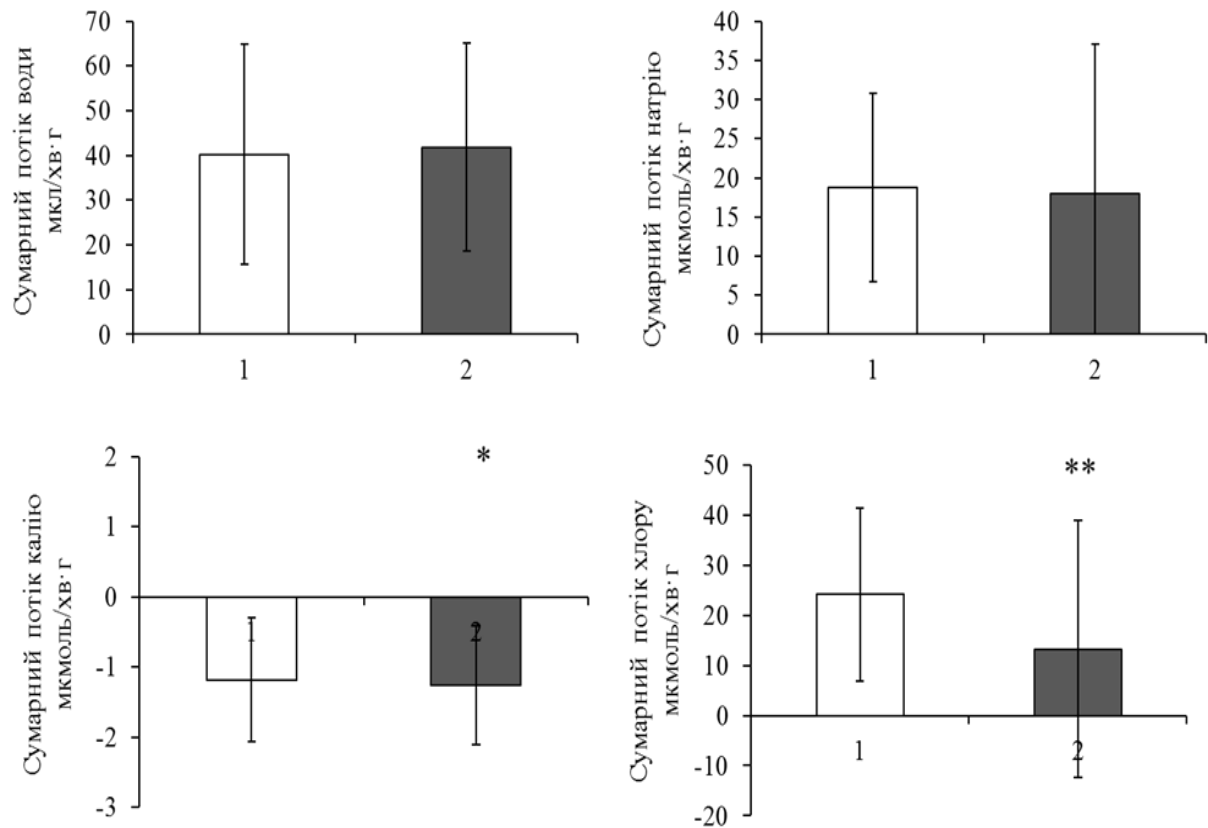


Рис. 3.5. Сумарний потік води, йонів натрію, кальцію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=9); 2 – цефтріаксон (n=5);

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ відносно контролю.

Отже, отримані результати вказують на зміни у рівні сумарного току йонів хлору в залежності від збільшення тривалості введення антибіотику та підвищення його дози.

Регуляція транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки здійснюється ентеральною нервовою системою, яка реагує на стимули, що надходять із просвіту кишечника [121]. Тому зміни у складі мікрофлори і особливо її метаболічній активності можуть призводити до зрушень у всмоктувальній функції. Важливою ланкою нормальної всмоктувальної

функції товстої кишки є коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК – масляна, пропіонова та ін.), що утворюються при ферментації харчових волокон та є одними із основних продуктів життєдіяльності нормальної мікробіоти товстої кишки (біфідобактерій, бактероїдів та ін.). Слід зауважити, що всмоктування КЛЖК колоноцитами пригнічує базальну та цАМФ-залежну секрецію хлору через CFTR канали, тим самим сприяючи домінуванню всмоктування над секрецією [122]. Отже, кількісні та функціональні зміни нормобіоти кишечника на фоні антибіотикотерапії [123-124], можуть впливати на всмоктувальну функцію товстої кишки через КЛЖК.

Крім того, викликаний антибіотиками зсув у складі кишкової мікробіоти може спричинювати розвиток прозапальних змін в слизовій оболонці кишечника [125], які, скоріш за все, пов'язані з активацією тучних клітин кишечника і вивільненням просекреторного медіатора гістаміну. Гістамін, у свою чергу, стимулює секрецію води [126], що є захисним механізмом у попередженні контакту просвітної мікробіоти з епітеліальними клітинами кишечника, а також колонізації пристінкового шару слизу умовно-патогенними бактеріями.

Також, не можна виключити прямого ефекту антибіотиків на функціонування транспортерів для йонів. Оліупук та співав. [127] показали дозозалежне підвищення секреції йонів хлору епітеліальними клітинами за умов інкубації з антибіотиком групи макролідів, азітроміцином. Цей ефект був пригнічений при спільному інкубуванні з блокатором CFTR каналів.

3.2. Дослідження впливу цефіксиму на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

Серед відомих механізмів ААД виділяють вплив на моторну функцію кишечника (наприклад макроліди з 14-членним лактонним кільцем) чи підвищення внутрішньопросвітного осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків (наприклад цефоперазон, цефіксим). Цефіксим

належить до цефалоспоринів III покоління і має найдовший період напіврозпаду серед усіх пероральних цефалоспоринів. Цефіксим накопичується у високих концентраціях у сечі, нирках і сечовивідних шляхах [128]. Ми порівняли ефекти цефтріаксону та цефіксиму на транспортну функцію епітелію товстої кишки. Пероральне введення цефіксиму, на відміну від цефтріаксону, не викликало діареї у щурів.

В результаті перевірки його впливу на транспортну функцію епітелію товстої кишки щурів встановлено, що 7-добове введення цефіксиму (рис. 3.6) зумовлює збільшення рівня всмоктування води з $22,65 \pm 71,37$ до $65,80 \pm 129,27$ мкл/хв*г та хлору з $0,27 \pm 21,05$ до $24,41 \pm 28,11$ мкмоль/хв*г. Сумарний потік натрію знижувався з $12,95 \pm 26,44$ до $3,40 \pm 24,84$ мкмоль/хв*г,

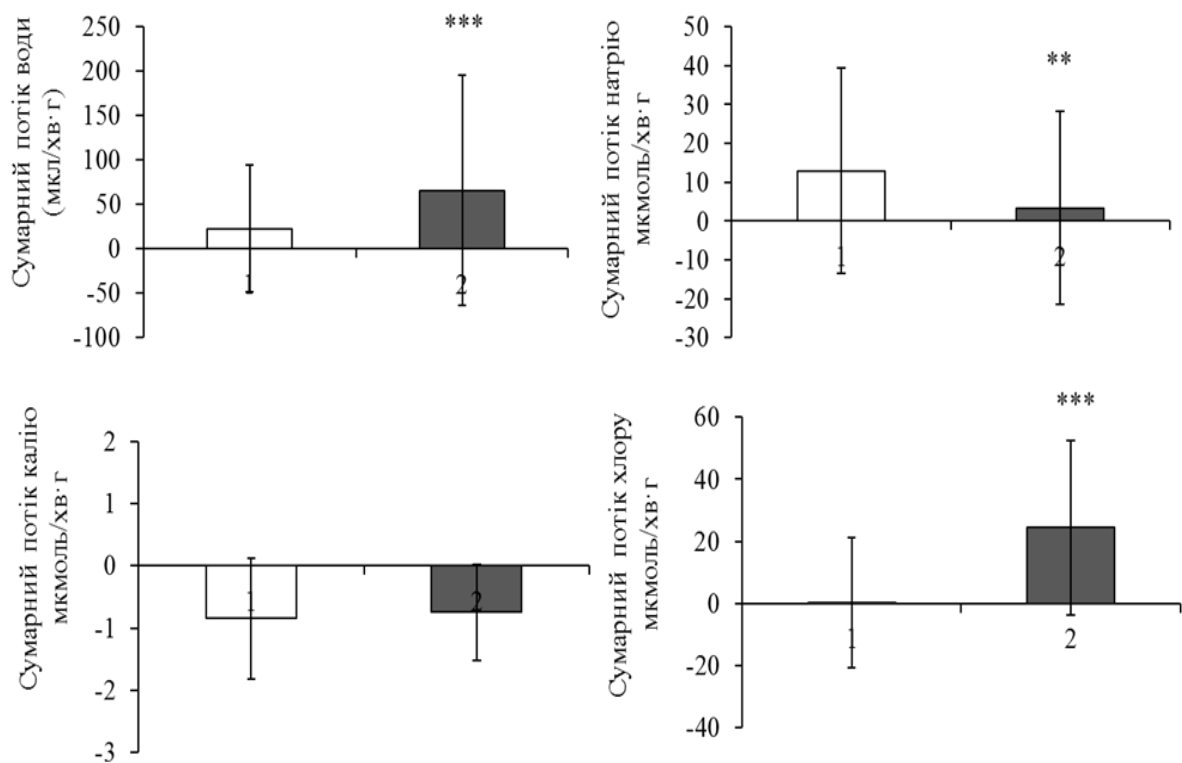


Рис. 3.6. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після введення антибіотику групи цефалоспоринів цефіксиму (10 мг/кг, *per os*), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=10); 2 – цефіксим (n=13);

** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

тоді як сумарний транспорт йоннів калію вірогідно не змінювався ($-0,85 \pm 0,97$ до $-0,75 \pm 0,77$ мкмоль/хв*Г).

Отже, ефект, викликаний цефіксимом, який також належить до антибіотиків цефалоспоринового ряду, відрізняється від ефектів цефтріаксону на транспортну функцію епітелію товстої кишки щурів. Це може свідчити на користь різної природи механізму ААД в залежності від шляху введення антибіотику (цефтріаксон – парентерально) і, можливо, природи антибіотичної дії. Для перевірки останнього провели наступну серію досліджень.

3.3. Дослідження впливу азитроміцину на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

Макроліди мають макроциклічне лактонне кільце (макролідне кільце), яке з'єднане з одним або кількома вуглеводневими залишками. Залежно від числа атомів вуглецю, які входять до складу лактонного кільця, макроліди поділяються на 12-, 14-, 15-, 16- та 17-членні. Препарати групи макролідів порушують синтез білка, що призводить до пригнічення розмноження і зниження вірулентності мікробних клітин через зворотне зв'язування з каталітичним пептидил-трансферазним центром 50S-субодиниці рибосом [129].

Пероральне введення макроліду азитроміцину також не викликало діареї у щурів, на відміну від цефтріаксону. Проте, спостерігались значні зміни у показниках сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів (рис. 3.7).

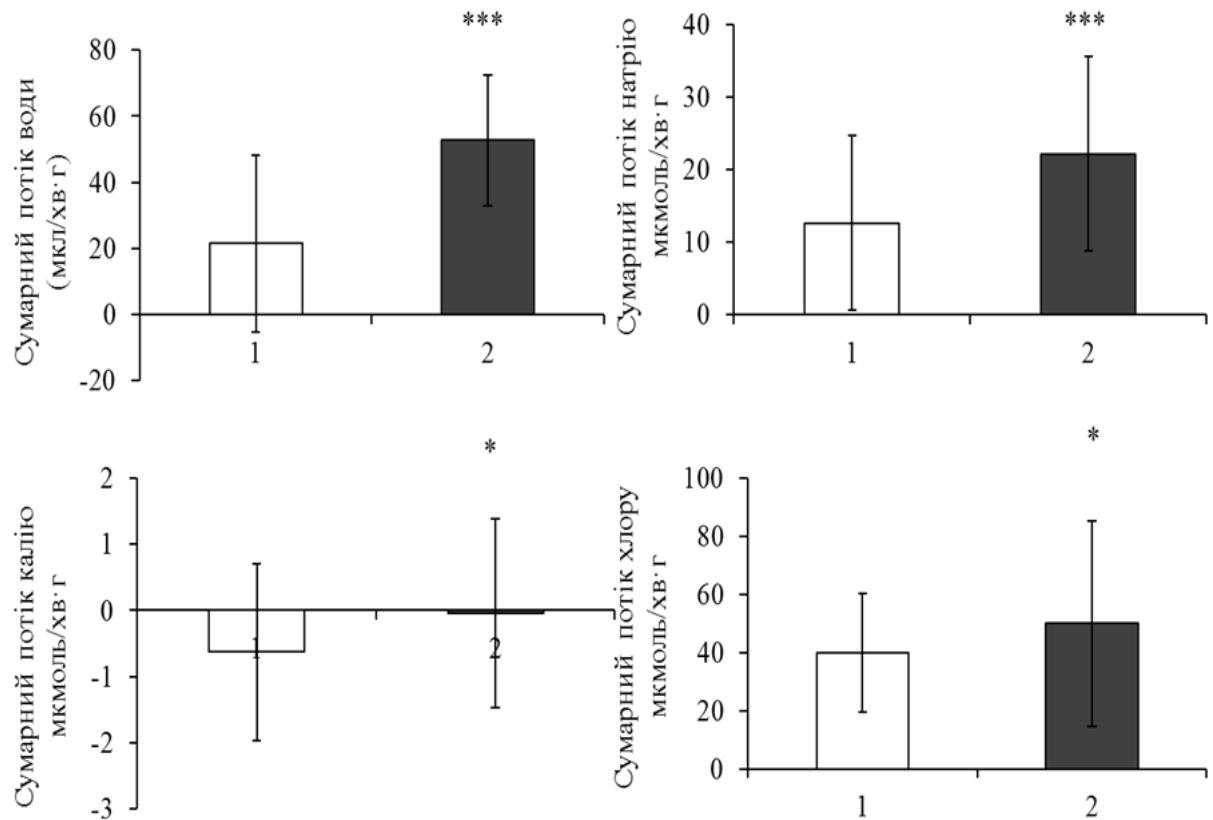


Рис. 3.7. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після введення антибіотику групи макролідів азитроміцину (15 мг/кг, *per os*), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=6); 2 – азитроміцин (n=6);

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Так, 5-добове введення азитроміцину в антибіотичній дозі (15 мг/кг) не спричинювало змін у масі тіла досліджуваних тварин та характері випорожнень. Сумарний транспорт води через епітелій товстої кишки в контрольній групі щурів становив $21,51 \pm 26,71$ мкл/хв·г. Введення азитроміцину призводило до збільшення всмоктування води до $52,74 \pm 19,79$ мкл/хв·г ($p < 0,001$). Аналогічна картина спостерігалася з сумарним потоком йонів натрію в контрольній групі він становив $12,64 \pm 12,04$ мкмоль/хв·г, а в дослідній групі $22,17 \pm 13,38$ мкмоль/хв·г ($p < 0,001$).

В ході експерименту у щурів дослідної групи спостерігалось значне зменшення секреції калію, а, в окремих випадках, навіть реверсія секреції на абсорбцію. Так, в контрольній групі показник сумарного транспорту калію дорівнював $-0,63 \pm 1,33$ мкмоль/хв*г, а в групі що отримували азитроміцин - $-0,04 \pm 1,43$ мкмоль/хв*г ($p < 0,05$).

Отримані результати щодо току йонів хлору показують, що зміни в його транспорті позитивно корелюють зі змінами у транспорті води. Так, сумарний транспорт йонів хлору через епітелій товстої кишки в контрольній групі становив $39,94 \pm 20,48$ мкмоль/хв*г, після 5-добового введення азитроміцину цей показник збільшувався до $49,95 \pm 35,44$ мкмоль/хв*г ($p < 0,05$).

За даними літератури антибіотики групи макролідів в 2-5% випадків викликають ААД [101]. З отриманих нами результатів видно, що 5-добове введення азитроміцину не спричиняло розвитку ААД. Навпаки, азитроміцин значно посилював процеси всмоктування, як води, так і йонів Na^+ та Cl^- , а секреція йонів K^+ зменшувалась. Азитроміцин за рахунок своєї хімічної будови суттєво відрізняється за своїми властивостями від інших антибіотиків групи макролідів. Зокрема, на відміну від еритроміцину, він має мінімальний вплив на моторику травного тракту, а також здатен прямо впливати на хлорні CFTR-канали [127, 130].

Крім цього, азитроміцин здатен пригнічувати секрецію рідини, асоційовану з розвитком запального процесу. Даний ефект опосередковується дією азитроміцину на експресію прозапальних цитокінів [131].

Висновки

1. 5-добове введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг (в.м.) призводило до зменшення всмоктування води, йонів натрію та секреції калію, у транспорті хлору змін не було. Підвищення дози антибіотику до 300 мг/кг (в.м.) у щурів зменшувало всмоктування води, йонів хлору та секрецію йонів калію щодо йонів натрію достовірних змін ми на спостерігали.

2. 14-добове введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг зумовлювало вірогідне зменшення всмоктування води, йонів хлору та секрецію йонів калію та збільшувало всмоктування натрію. При підвищенні дози до 300 мг/кг в сумарному потоці води та натрію змін ми не спостерігали, але зменшувалося всмоктування хлору та збільшувалася секреція калію.

3. 7-добове введення цефіксиму (10 мг/кг, *per os*) зумовлювало збільшення всмоктування води та хлору, зниження всмоктування натрію та не впливало на сумарний потік калію.

4. 5-добове введення азитроміцину (15 мг/кг, *per os*) призводило до збільшення всмоктування води, натрію та хлору, сумарний потік калію зменшувався.

5. Ефекти викликані цефіксимом та азитроміцином, які на відміну від цефтріаксону вводили перорально, відрізняються від останнього. Це дозволяє припустити, що механізм ААД може залежати не лише від природи антибіотичної дії, але і від шляху введення антибіотику.

РОЗДІЛ 4

МЕХАНІЗМИ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ НА ТРАНСПОРТНУ ФУНКЦІЮ ЕПІТЕЛІЮ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ

4.1. Дослідження ролі йонних транспортерів та аквапоринового транспорту в механізмах дії антибіотиків на транспортну функцію товстої кишки

Всмоктувальна здатність епітелію товстої кишки залежить від активності та числа транспортерів для йонів та води: переважно аквапоринових каналів зокрема AQP8, електронейтрального обмінника Na^+/H^+ (NHE3), електрогенних Na^+ каналів (ENaC), електрогенних Cl каналів (CFTR) та інших (DRA, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, HCO_3^-/Cl) [132].

Для перевірки молекулярної природи порушення транспортної функції епітелію товстої кишки за дії антибіотику цефтріаксону ми вимірювали експресію основних йонних транспортерів та транспортери до води (аквапорини) в слизовій оболонці товстої кишки після 5- та 14-добового введення цефтріаксону.

4.1.1. Експресія транспортерів йонів в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону

Експресія Na^+/H^+ обмінника (NHE3/Slc9a3) не змінювалась після 5-добового введення цефтріаксону та була збільшена в 2,4 рази ($p < 0,001$) після 14-добового введення цефтріаксону порівняно з контрольною групою (рис. 4.1).

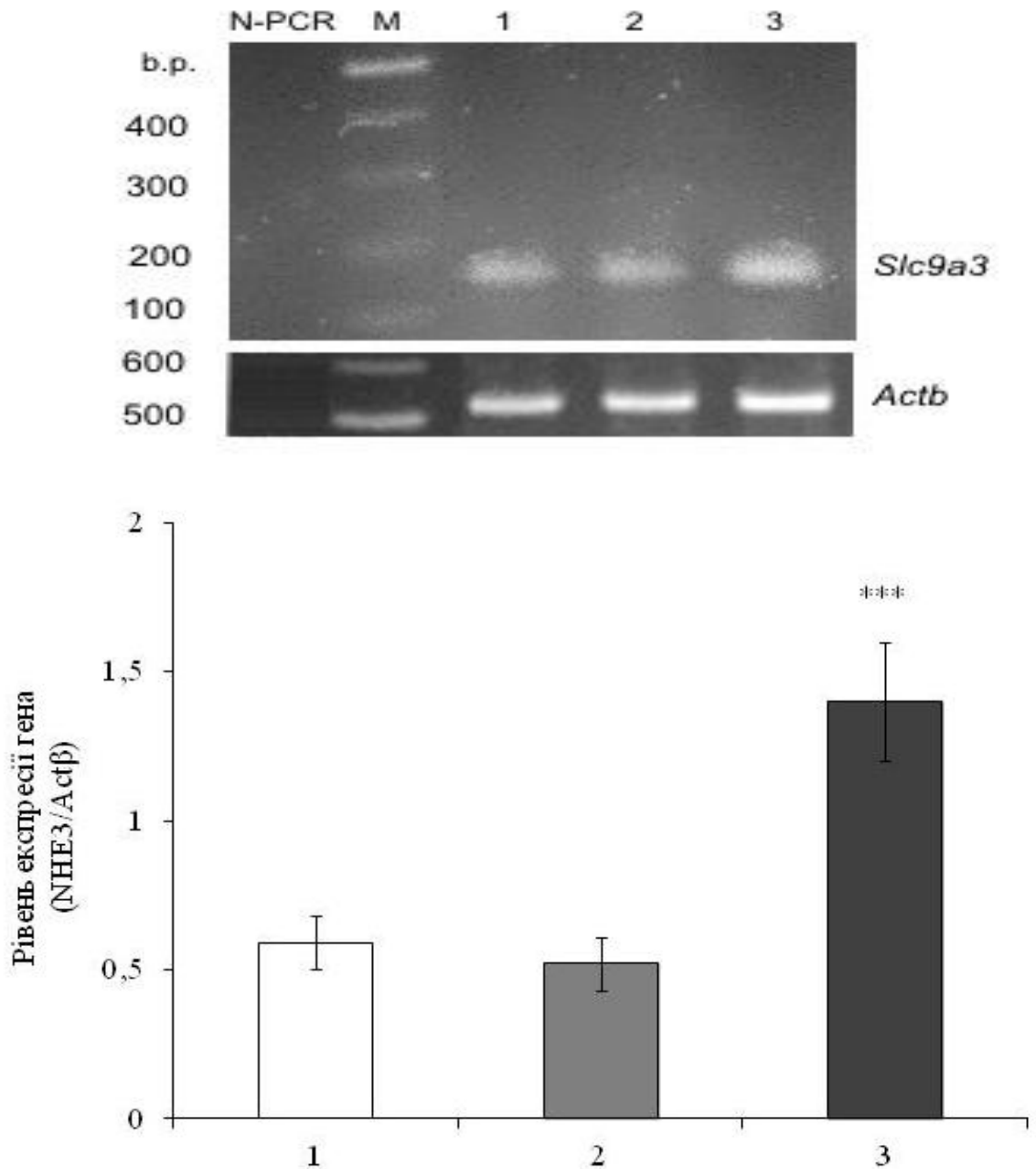


Рис. 4.1. Рівень експресії натрієвого каналу NHE3/Slc9a3 (нормалізовано за рівнем Actb) на фоні 5- та 14-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг в.м. ($M \pm SD$).

1 – контроль (n=5); 2 – цефтріаксон 5 діб (n=5); 3 – цефтріаксон 14 діб (n=5).

*** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Експресія електрогенних натрієвих каналів ENaC/Scnn1b знизилася в 1,4 рази ($p < 0,05$) після 5-добового введення цефтріаксону, та, навпаки,

збільшилася в 1,6 ($p < 0,01$) після 14-добового введення цефтріаксону відносно показників у контрольній групі (рис. 4.2).

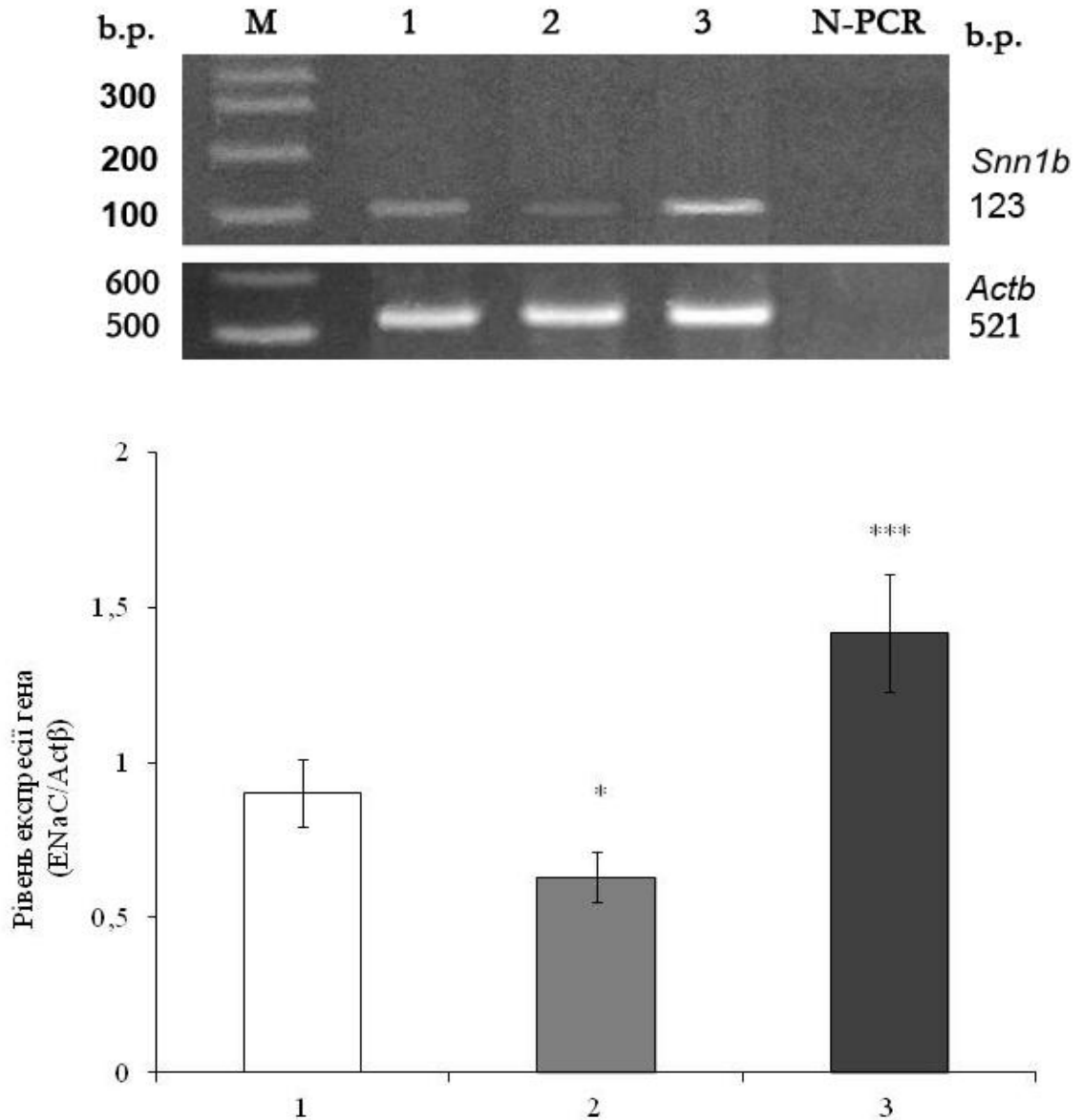


Рис. 4.2. Рівень експресії натрієвого каналу ENaC/Scnn1b (нормалізовано за рівнем Actb) на фоні 5- та 14-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг в.м. ($M \pm SD$).

1 – контроль ($n=5$); 2 – цефтріаксон 5 діб ($n=5$); 3 – цефтріаксон 14 діб ($n=5$).

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі

Експресія електрогенного хлорного каналу CFTR збільшилася в 1,4 рази ($p < 0,001$) та в 1,9 рази ($p < 0,001$), відповідно після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (рис. 4.3).

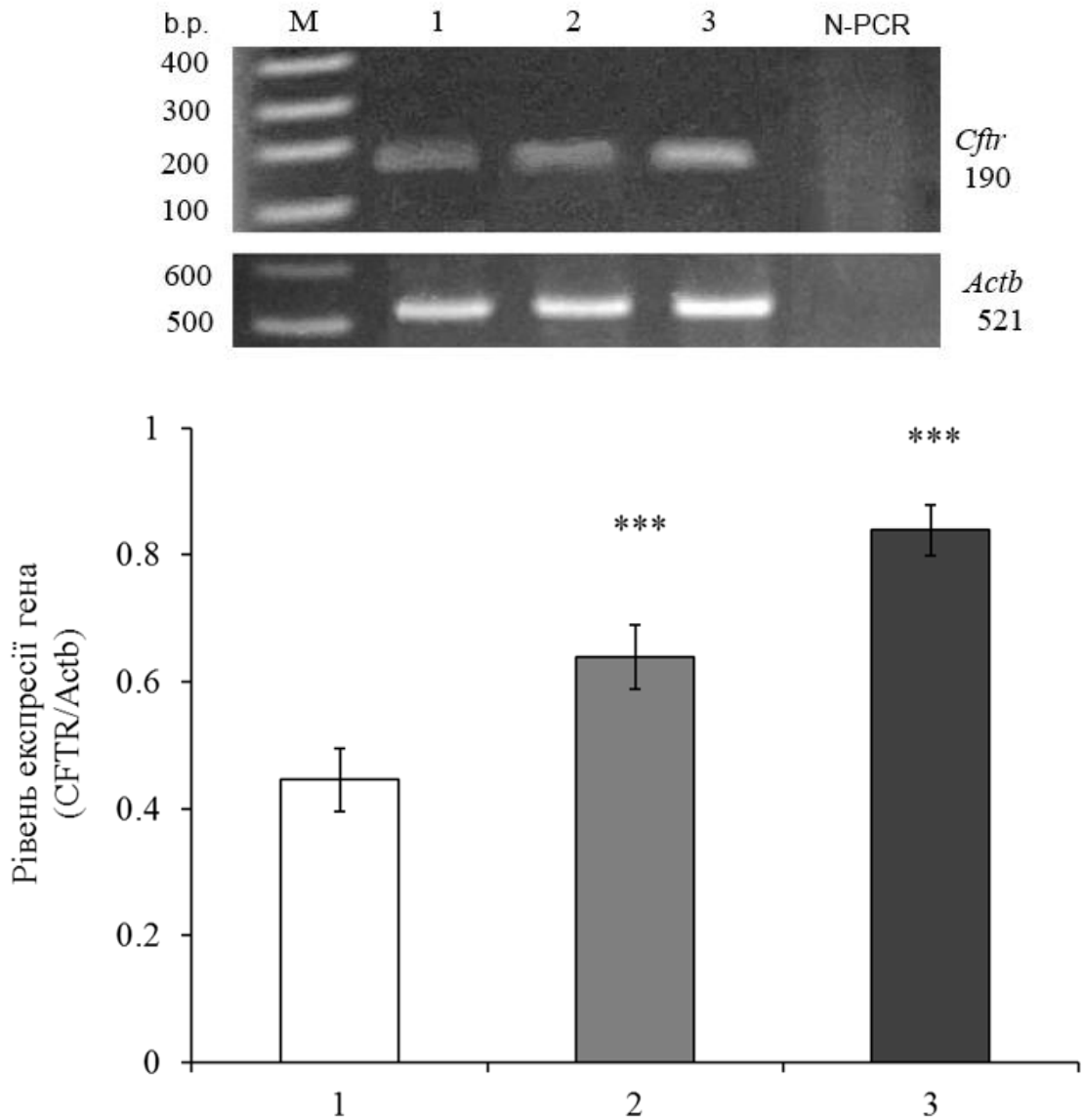


Рис. 4.3. Рівень експресії електрогенного хлорного каналу CFTR нормалізовано за рівнем (*Actb*) на тлі 5- та 14-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг в.м. ($M \pm SD$):

1 – контроль (n=5); 2 – цефтріаксон 5 діб (n=5); 3 – цефтріаксон 14 діб (n=5);

*** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі

Клінічно ми спостерігали зменшення числа тварин з діареєю на фоні 14-добового введення цефтріаксону. Це повністю відповідає збільшенню всмоктування натрію, що супроводжується підвищенням експресії електрогенних Na^+ каналів, ENaC та електронейтрального транспортера Na^+ , Na^+/H^+ обмінника. Також нами спостерігалось збільшення експресії електрогенних Cl^- каналів CFTR та зменшення сумарного всмоктування йонів Cl^- . Ми припускаємо, що цей ефект є захисним і направлений на збільшення секреції слизу та «вимивання» умовно-патогенної мікробіоти. Ми перевірили дане припущення, а результати досліджень будуть представлені в наступних підрозділах.

4.1.2. Роль аквапаринових каналів AQP8 в механізмах антибіотикасоційваної діареї після введення цефтріаксону та азитроміцину

Встановлено, що в слизовій оболонці товстої кишки щурів за нормальних умов експресуються аквапоринові канали AQP8, що далі підтверджує їх важливу роль в підтриманні водно-електролітного гомеостазу організму [133]. Нами показано порушення транспорту води через епітелій товстої кишки щурів після застосування цефтріаксону чи азитроміцину (рис. 3.2; рис. 3.7). Ми припустили, що це може бути пов'язано зі змінами у експресії AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки. Дослідженню цього питання були присвячені наступні серії експериментів.

Експресії аквапоринових каналів AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону. Ми не спостерігали значних змін в експресії мРНК водного каналу AQP8 після 5-та 14-добового введення цефтріаксону (рис. 4.4).

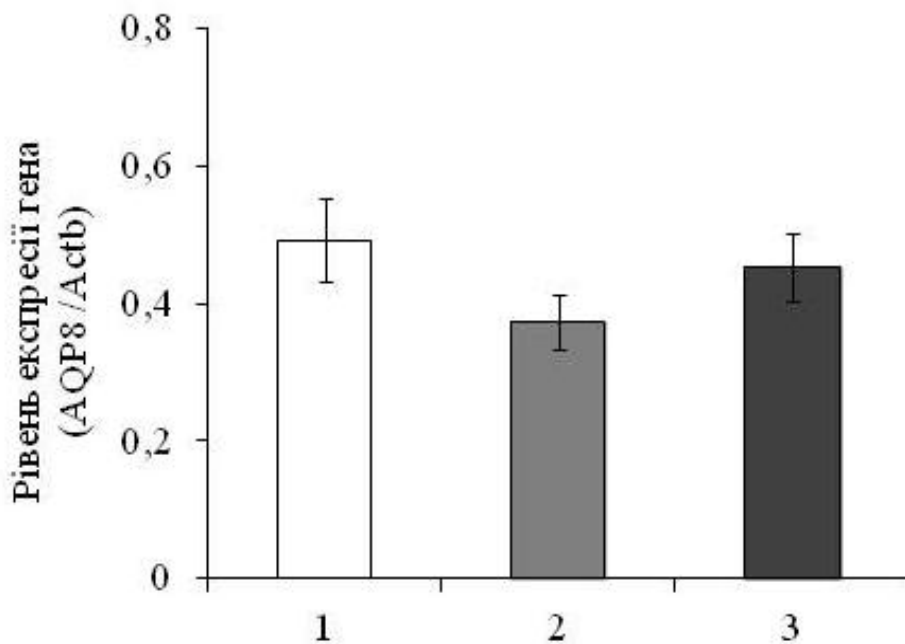
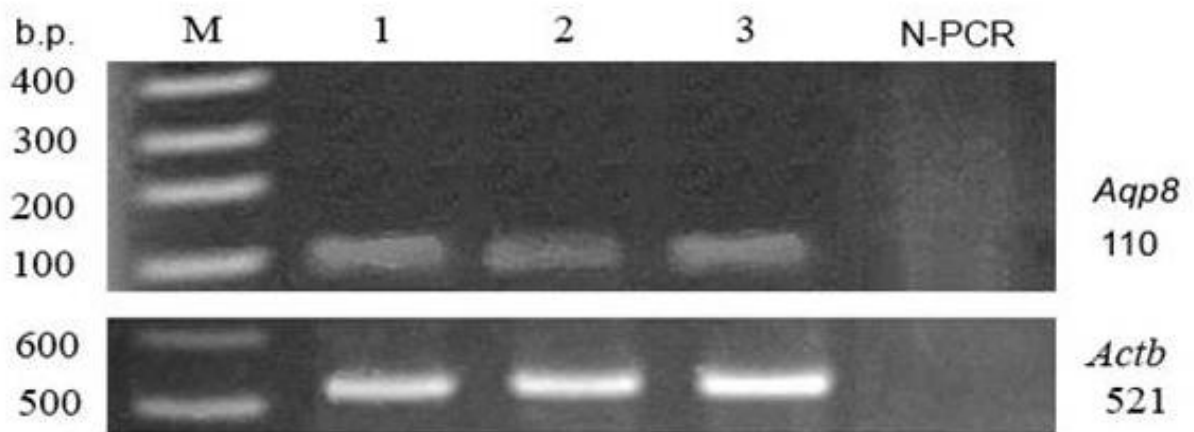


Рис. 4.4. Рівень експресії водного каналу (AQP8/Actb) на фоні 5- та 14-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг в.м. (M±SD):

1 – контроль (n=5); 2 – цефтріаксон 5 діб (n=5); 3 – цефтріаксон 14 діб (n=5);

У зв'язку з тим, що рівень мРНК не завжди відображає рівень протеїнів, що кодується, ми перевірили відносну кількість протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону методом Вестерн блот аналізу. Введення цефтріаксону впродовж 5 днів не викликало статистично вірогідних змін у рівні протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис. 4.5). В контрольній

групі ці показники дорівнювали $2,94 \pm 0,5$ ум.од. в дослідній – $3,85 \pm 1,03$ (ум.од).

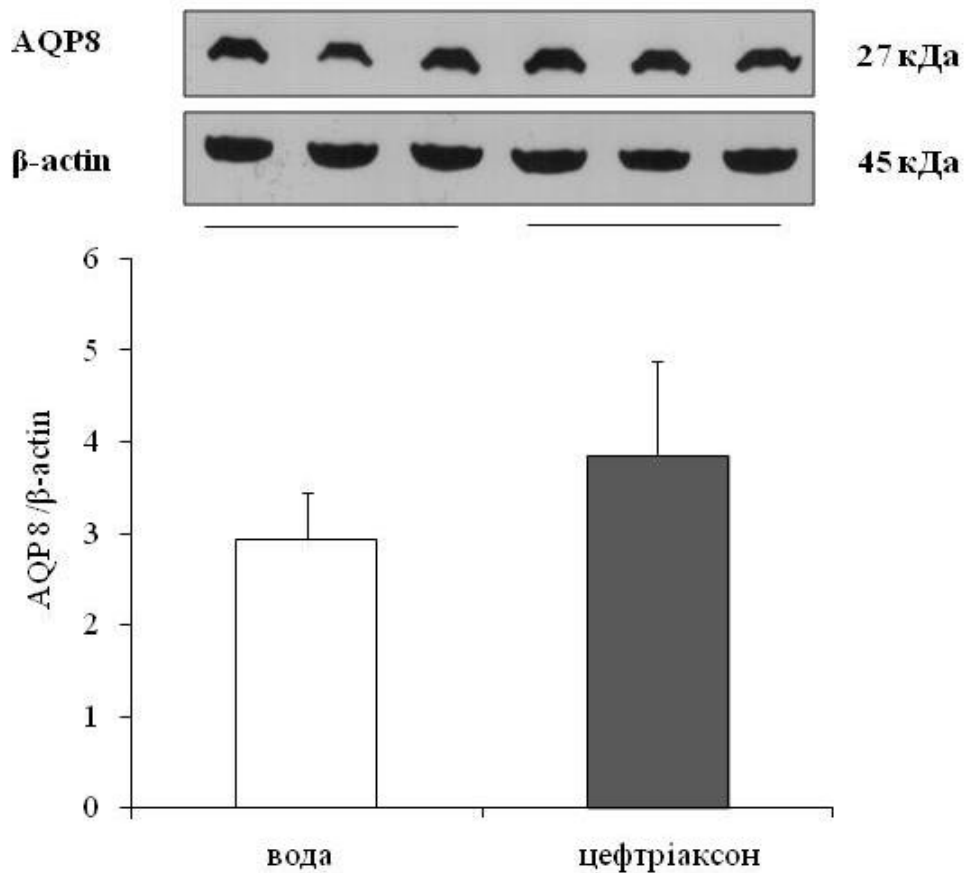


Рис. 4.5. Вестерн блот аналіз рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, після 5-добового введення антибіотику цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово, n=5) нормалізованого за рівнем білку «домашнього господарства» β-actin (M±SD).

Протилежна картина спостерігалася після 14-добового введення цефтріаксону. У групі щурів, які отримували цефтріаксон, рівень AQP8 був зменшений в 3 рази ($p < 0,001$) (рис. 4.6).

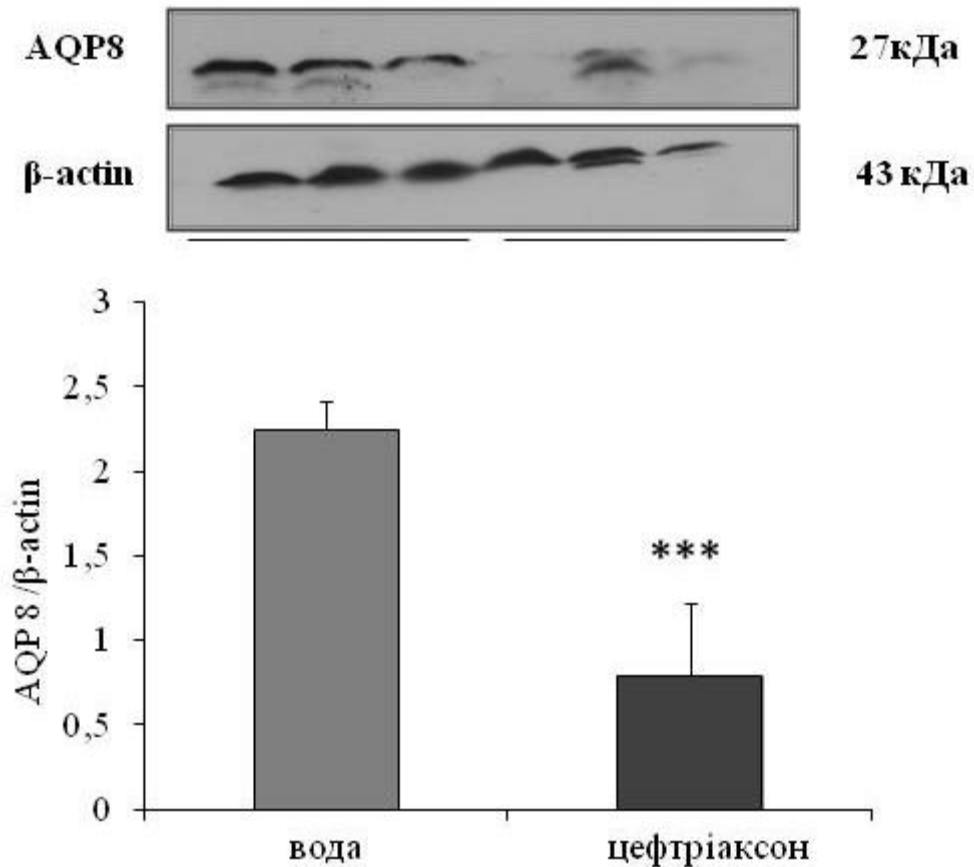


Рис. 4.6. Вестерн блот аналіз рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, після 14-добового введення антибіотику цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово, n=5) нормалізованого за рівнем білку «домашнього господарства» β-actin, (M±SD);
 *** – p<0,001 відносно показників в контрольній груп.

В попередніх дослідженнях нами встановлено зменшення всмоктування води через епітелій товстої кишки щурів, як після 5- так і 14-добового введення цефтріаксону, що проявлялось клінічними ознаками діареї у 15% тварин [134]. Відповідно до отриманих нами даних можна припустити, що зменшення сумарного транспорту води після 5-добового введення цефтріаксону пов'язано, переважно, з порушенням всмоктування електролітів. Після 14-добового введення цефтріаксону ефект посилюється за рахунок зменшення кількості аквапоринових каналів.

Порівняльний аналіз рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтріаксону та азитроміцину. Нами встановлено, що на відміну від цефтріаксону, азитроміцин підвищував всмоктувальну здатність товстої кишки щурів (підр. 3.3). Таким чином ми припустили, що на протипагу ефекту цефтріаксону, азитроміцин повинен збільшувати рівень AQP8. В наших дослідженнях щоденне введення щурам антибіотику групи макролідів азитроміцину зумовлювало підвищення рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів в 1,2 разів ($p < 0,05$) (рис. 4.7).

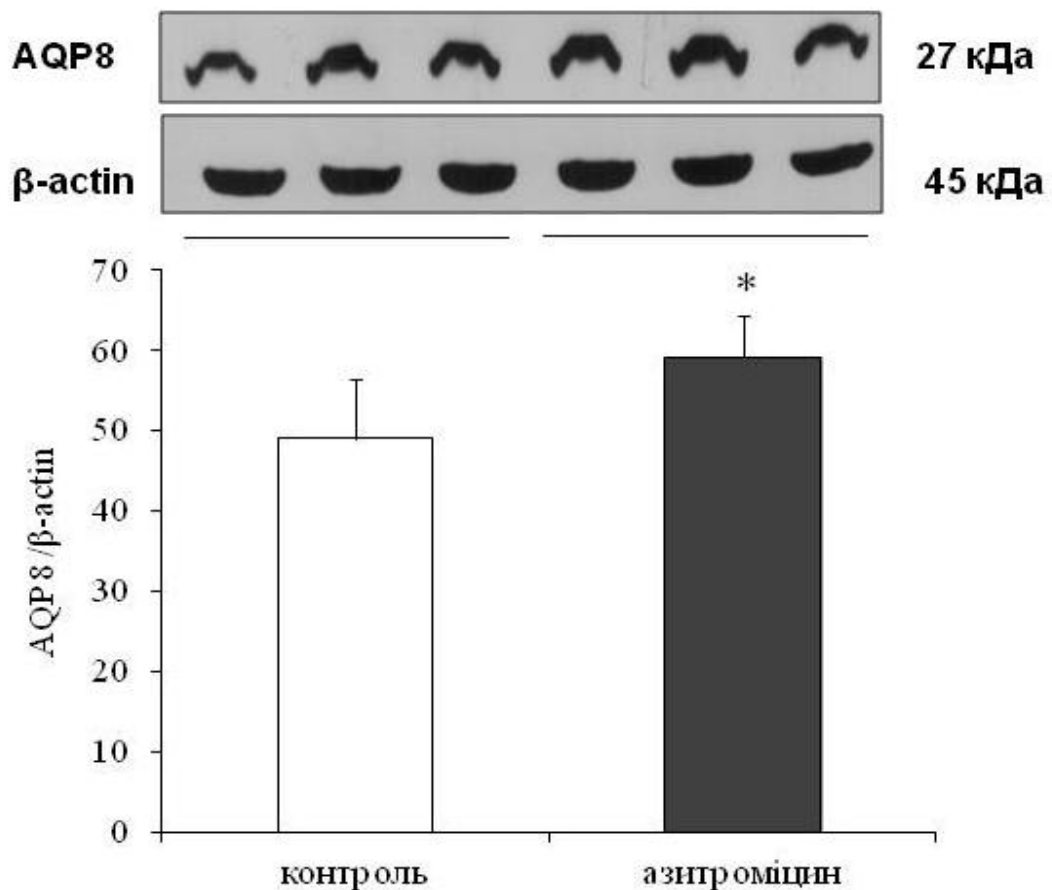


Рис. 4.7. Вестерн блот аналіз рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-добового введення антибіотику азитроміцину (15 мг/кг, *per os*, $n=6$), нормалізованого за рівнем білку «домашнього господарства» β -actin, ($M \pm SD$);

* – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Отже, встановлене в даних експериментах підвищення рівня протеїну AQP8 може бути одним із механізмів азитроміцин-викликаних зрушень у транспортній функції епітелію товстої кишки.

Отримані нами дані свідчать, що порушення у транспортній функції епітелію товстої кишки після парентерального введення антибіотику цефалоспоринового ряду цефтріаксону пов'язано зі змінами в експресії йонних транспортерів та аквапаринового транспортеру AQP8. Ці зміни відрізняються після короткого (5 днів) та довготривалого (14 днів) курсу антибіотикотерапії. 5-добове введення цефтріаксону викликало просекреторні зміни в епітелії товстої кишки. На молекулярному рівні це супроводжувалось зниженням експресії мРНК електрогенних натрієвих каналів ENaC/Scnn1b, які відповідають за активне всмоктування йонів натрію; збільшенням експресії мРНК електрогенних хлорних каналів CFTR, які обумовлюють секрецію хлору. Експресія мРНК електронейтрального Na^+/H^+ обмінника (NHE3/Slc9a3) не змінювалась. Після 14-добового введення цефтріаксону відбувалось підвищення всмоктування Na^+ , проте спостерігалась реверсія абсорбції на секрецію Cl^- , що на молекулярному рівні супроводжувалось підвищенням експресії мРНК ENaC та Na^+/H^+ обмінника. При цьому, спостерігалось збільшення експресії мРНК CFTR та AQP8 відносно показників після 5 діб. Отримані нами дані можуть бути механістичним поясненням транзиторної природи клінічних проявів ААД.

4.2. Рівень секреції слизу в товстій кишці щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону

Слизова оболонка товстої кишки покрита шаром слизу [135-136], який захищає епітелій від механічних пошкоджень та хімічних подразників [137]. Слиз - це в'язкий секрет, який складається на 95% з води і містить

електроліти, білки, нуклеїнові кислоти, ферменти, імуноглобуліни та муцини [138]. Муцин є найбільш важливим компонентом слизу та відповідає за його фізичні і хімічні властивості [139-140]. Муцини – це високомолекулярні глікопротеїни, відповідальні за гелеутворюючі властивості слизу [141]. Муцин поліпшує видалення слизу і діє як субстрат для кишкових бактерій [142-143]. В кишечнику слиз продукується келихоподібними клітинами [144].

Для перевірки стану слизового бар'єру в різні терміни введення цефтріаксону ми визначали кількість поверхневого слизу на ділянці товстої кишки щурів (рис. 4.8). Ми використовували ШИК-реакцію, яка дозволяє виявляти дозволяє детектувати загальний вміст гліканової частини глікопротеїнів. Введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) впродовж 5-днів призводило до зменшення секреції слизу більш ніж у 3 рази ($p < 0,01$). Після 14-добового введення цефтріаксону ми, навпаки, спостерігали посилення секреції слизу і, відповідно, його збільшення в 2 рази ($p < 0,05$).

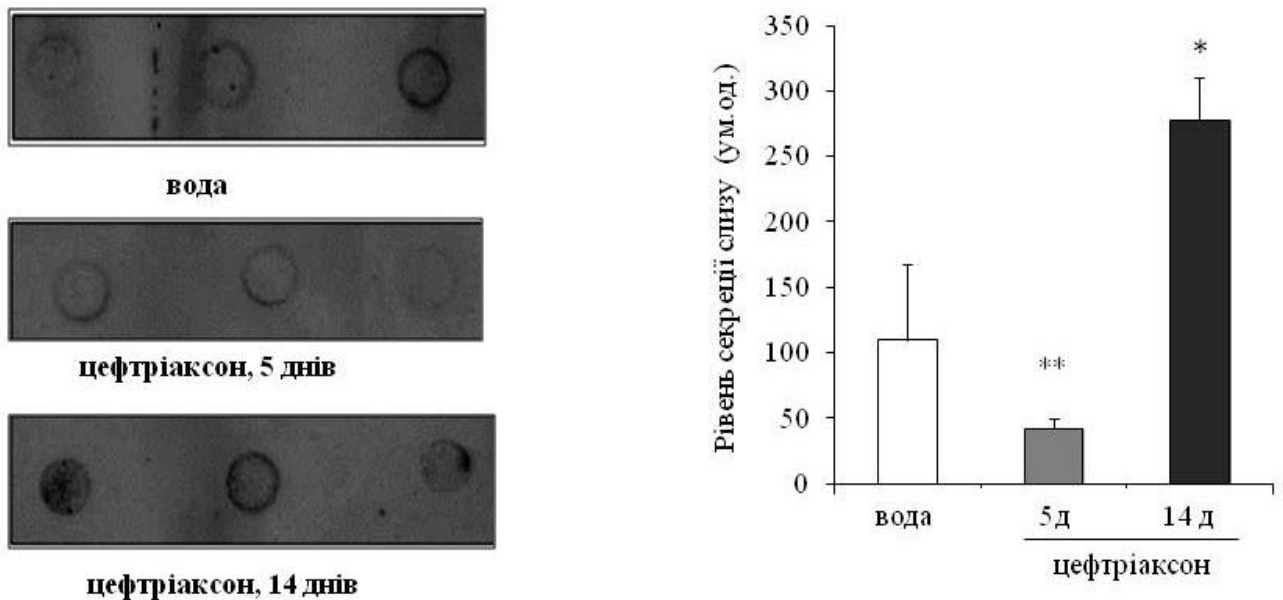


Рис. 4.8. Рівень секреції слизу слизовою оболонкою товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) ШИК-реакція на PVDF мембрані;

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, відносно показників у контрольній групі.

Для пояснення даного феномену ми висунули припущення, що збільшення тривалості введення антибіотику значно зрушує нормобіотний гомеостаз кишечника і, відповідно, сприяє порушенню слизового бар'єру. Це, в свою чергу, викликає захисну реакцію у вигляді підвищення секреції слизу в просвіт кишки. Згідно літературних даних, динамічні зміни в рівні секреції та складі поверхневого слизу є частиною захисного механізму проти патогенної мікробіоти. Причому, цей ефект тісно пов'язаний зі змінами в транспорті води та електролітів [187]. Це припущення підкріплюється даними про посилення секреції хлору саме після 14-добового введення цефтріаксону.

Порушення слизового бар'єру сприяє контакту мікробіоти з епітелієм кишечника і може запускати прозапальну відповідь.

4.3. Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки

Відомо, що у пацієнтів на тлі дисбіотичних процесів, які розвиваються при застосування антибіотиків, виникають прозапальні зміни в слизовій оболонці кишечника [145-147], що може, у свою чергу, викликати розлади транспортної функції епітелію.

Як відомо, тучні клітини залучені до процесів запалення в кишечнику [148], дегрануляція тучних клітин під дією нейромедіаторів та цитокінів є маркером запального процесу [149]. Під час дегрануляції тучних клітин, окрім інших медіаторів запалення, вивільняється гістамін [150].

Підвищений рівень гістаміну був виявлений у просвіті шлунково-кишкового тракту пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника [151-

152]. Встановлено, що H1-гістамінові рецептори беруть участь у регуляції транспорту йонів хлору через епітелій товстої кишки [153], а гістамін є важливим просекреторним агентом [154].

4.3.1. Морфометричний аналіз гістологічних зрізів товстої кишки щурів після введення цефтріаксону

На гістологічних препаратах товстої кишки щурів після 5-добового введення антибіотика цефтріаксону були виявлені значні зміни. Зокрема, у слизовій оболонці спостерігався виражений набряк і десквамація епітелію (табл. 4.1). Дані морфометрії свідчать про те, що достовірно збільшується

Таблиця 4.1.

Морфометричний аналіз слизової оболонки товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово), (M±SD)

Показники	Контроль	Цефтріаксон
Товщина слизової оболонки, мкм	138,03 ± 34,85	215,02 ± 34,85***
Глибина крипт, мкм	129,47 ± 18,5	179,42 ± 40,52***
Площа поперечного перерізу ядер ентероцитів, мкм ²	14,85 ± 4,85	20,52 ± 5,0***
Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин, мкм ²	72,94 ± 31,62	62,08 ± 28,55*

* – p<0,05; *** – p<0,001 відносно значень у контрольній групі.

товщина слизової оболонки в 1,5 рази (p <0,001) і глибина кишкових крипт в 1,4 рази, а також площа поперечного перерізу ядер ентероцитів в 1,4 рази

($p < 0,001$), що свідчить про збільшення їх функціональної активності. Антибіотик цефтріаксон призводить до збільшення кількості келихоподібних клітин, але зменшення їх площі в 1,2 рази ($p < 0,05$). Це свідчить про те, що в слизовій оболонці товстої кишки мають місце компенсаторні процеси.

Зміни в товстій кишці, ймовірно, відбуваються у відповідь на зниження вмісту нормобіоти і як компенсація відсутності певної ланки захисного бар'єру або біоплівки, утвореної мікробіотою.

4.3.2. Порівняльний аналіз ступеня дегрануляції тучних клітин після введення цефтріаксону та азитроміцину

На відміну від антибіотиків ряду макролідів, які використовуються для зменшення запалення та лікування алергічних реакцій, антибіотики ряду цефалоспоринів можуть мати побічну дію у вигляді алергічної реакції, що пов'язано з активацією тучних клітин і розвитком запалення [155]. Збільшення числа тучних клітин в слизовій оболонці товстої кишки може супроводжуватися розвитком діареї. Це доведено як на експериментальних моделях [156], так і в клінічних спостереженнях [157]. Показано, що блокатори H1-гістамінових рецепторів і стабілізатори мембрани тучних клітин зменшували прояви діареї [158]. Відомості щодо впливу цефалоспоринів на стан тучних клітин слизової оболонки товстої кишки, як однієї із причинних факторів розвитку діареї, відсутні.

Ми припустили, що прозапальні зміни за дії цефтріаксону і, пов'язана з ними діарея, є результатом активації тучних клітин слизової оболонки кишечника. Провели порівняльний аналіз рівня дегрануляції тучних клітин (показник активації клітин) після 5-добового введення азитроміцину чи цефтріаксону. Останній зумовлював зменшення кількості гранул тучних клітин у 2,4 рази ($p < 0,05$) порівнянно з контрольною групою тварин, тоді як азитроміцин не впливав на цей показник (рис. 4.9).

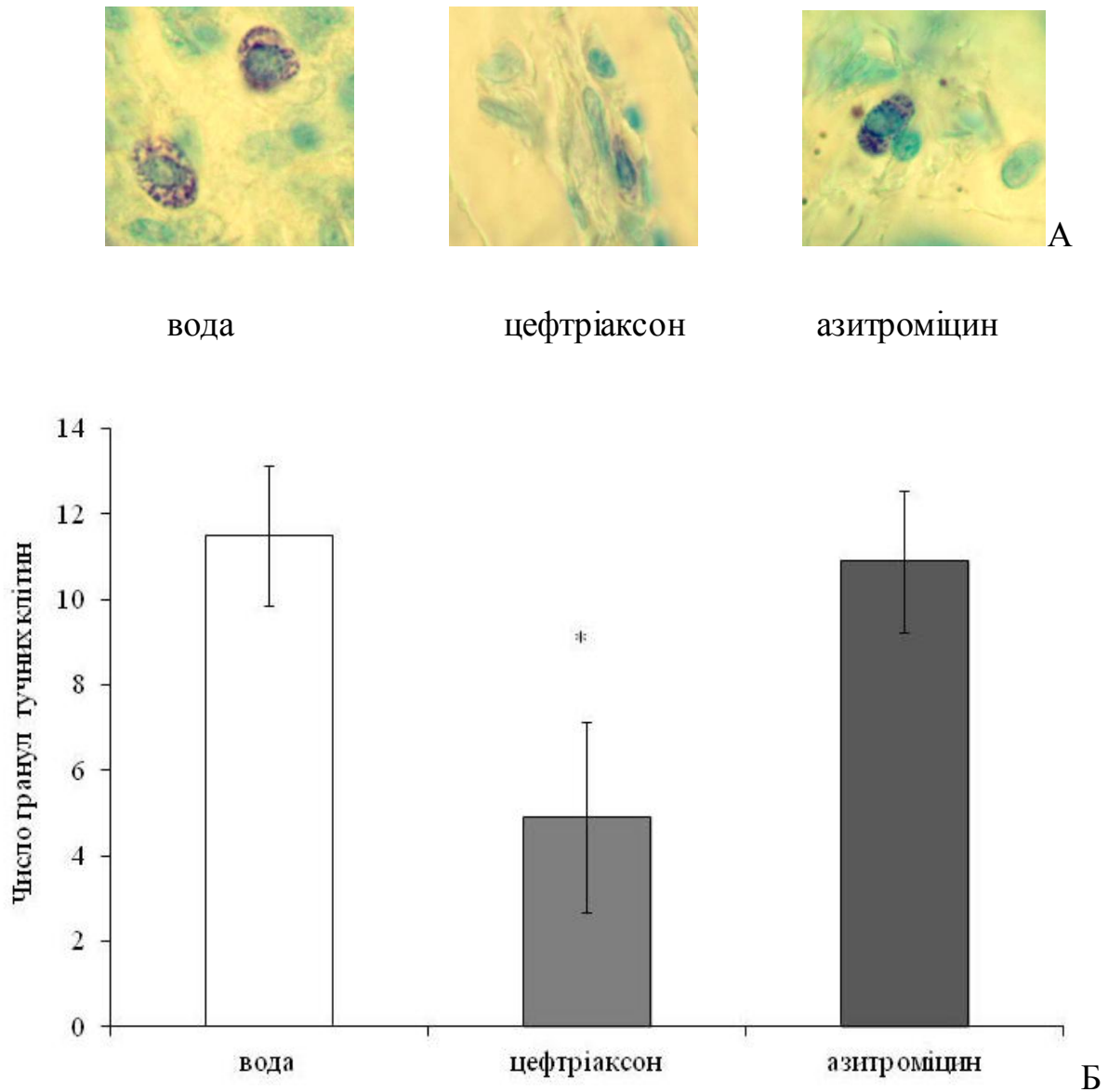


Рис. 4.9. Рівень дегрануляції тучних клітин після 5-добового введення азитроміцину (15 мг/кг, *per os*, n=5) та цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово, n=5), (M±SD): А – цитохімічне визначення тучних клітин толуїдиновим синім; Б – середнє значення кількості гранул на тучну клітину; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі

Отримані результати дозволяють припустити, що розвиток діареї за короткотривалої дії антибіотика групи цефалоспоринів цефтріаксону пов'язаний зі здатністю β -лактамних антибіотиків активувати тучні клітини [155]. Основним медіатором тучних клітин є гістамін – потужний стимулятор

секреції через епітелій товстої кишки [159]. Отже, наступним етапом нашої роботи було дослідження ролі гістаміну та його залучення до цефтріаксон-викликаних зрушень у транспорті води та електролітів через епітелій товстої кишки.

4.3.3. Дослідження впливу гістаміну на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

При інтраперитонеальному введенні гістамін у дозах 1,8; 3,6 чи 7,2 мг/кг не викликав статистично значущих змін у транспорті води через епітелій товстої кишки щурів.

При цьому внутрішньовенне введення гістаміну в дозі 3,6 мг/кг*год викликало статистично значуще ($p < 0,05$), зменшення абсорбції води, а в деяких випадках навіть реверсію абсорбції на секрецію. Ефект розвивався через 60 хв після початку інфузії гістаміну і тривав впродовж всього періоду експерименту. Також, спостерігалось вірогідне зниження всмоктування йонів натрію та секреції калію вже через 40 хв від початку інфузії (рис. 4.10). Статистично вірогідних змін рівня всмоктування йонів хлору зареєстровано не було.

При внутрішньовенному введенні, на відміну від інтраперитонеального, одночасно створюється висока концентрація гістаміну в крові, яка характерна для запальних процесів. Отже, щоб викликати діарею необхідні високі концентрації гістаміну.

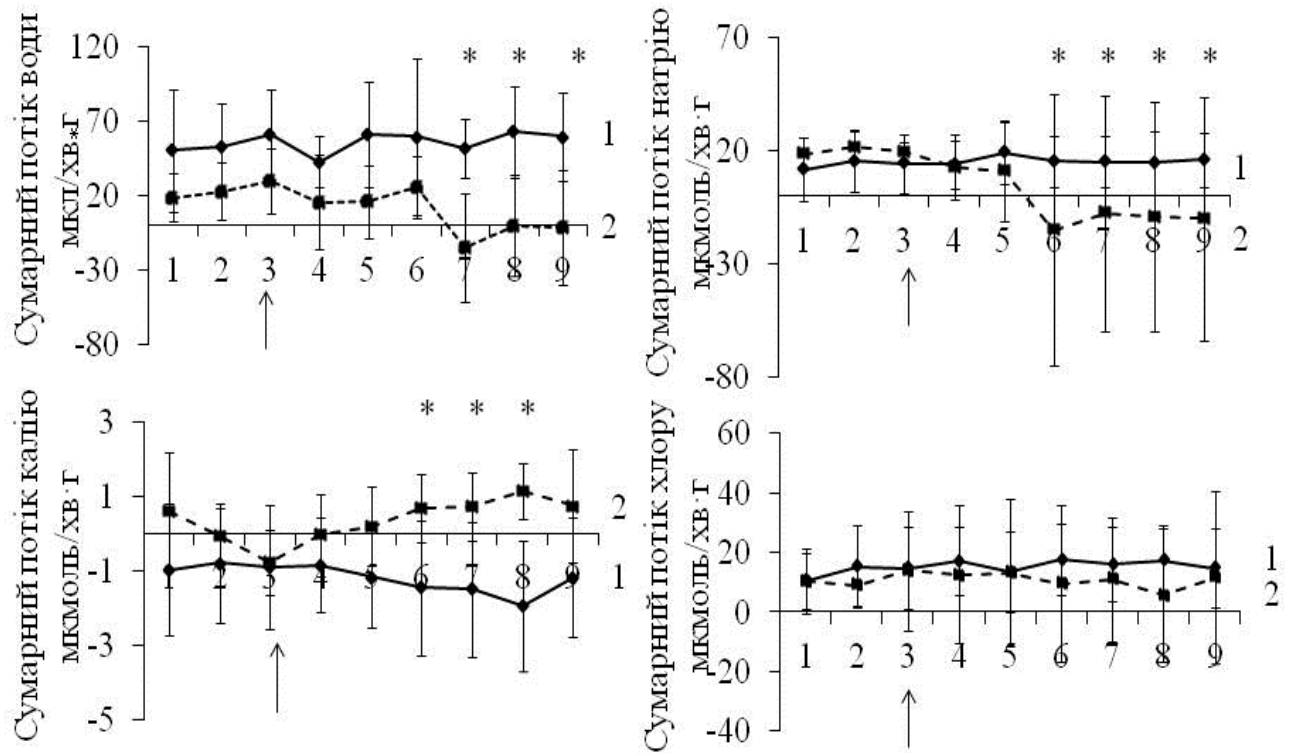


Рис. 4.10. Вплив гістаміну (3,6 мг/кг·год, внутрішньовенно) на сумарний потік води та йонів натрію, кальцію і хлору через епітелій товстої кишки. Стрілочками вказано початок введення води чи гістаміну ($M \pm SD$):

1 – вода (n=4); 2 – гістамін (n=5);

* – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

За рівнем всмоктування води, Na^+ , K^+ ефект гістаміну співпадає з таким цефтріаксону (див. підрозділ 3.1.), особливо, після його короткотривалого введення, що може опосередковано свідчити про можливу участь гістаміну в механізмах розвитку діареї на фоні введення цефтріаксону.

4.3.4. Дослідження ролі H_1 -гістамінових рецепторів в механізмах цефтріаксон-викликанної діареї у щурів

У дослідах на ізольованих препаратах товстої кишки людини Keely S.J. зі співав. [154] було показано, що саме H_1 , а не H_2 чи H_3 -гістамінові

рецептори опосередковують просекреторну дію гістаміну на транспорт електролітів через епітелій товстої кишки. Для перевірки гіпотези про те, що ефект цефтріаксону на потік води та електролітів, пов'язаний з виділенням гістаміну з тучних клітин та його впливом на H1-гістамінові рецептори, була проведена серія експериментів із одночасним введенням цефтріаксону та блокатора H1-гістамінових рецепторів лоратадином.

У результаті наших досліджень показано, що одночасне введення лоратадину (1,7 мг/кг, *per os*) з цефтріаксоном (50 мг/кг, в.м.) попереджає появу цефтріаксонвикликаних клінічних проявів діареї у щурів (рис. 4.11).

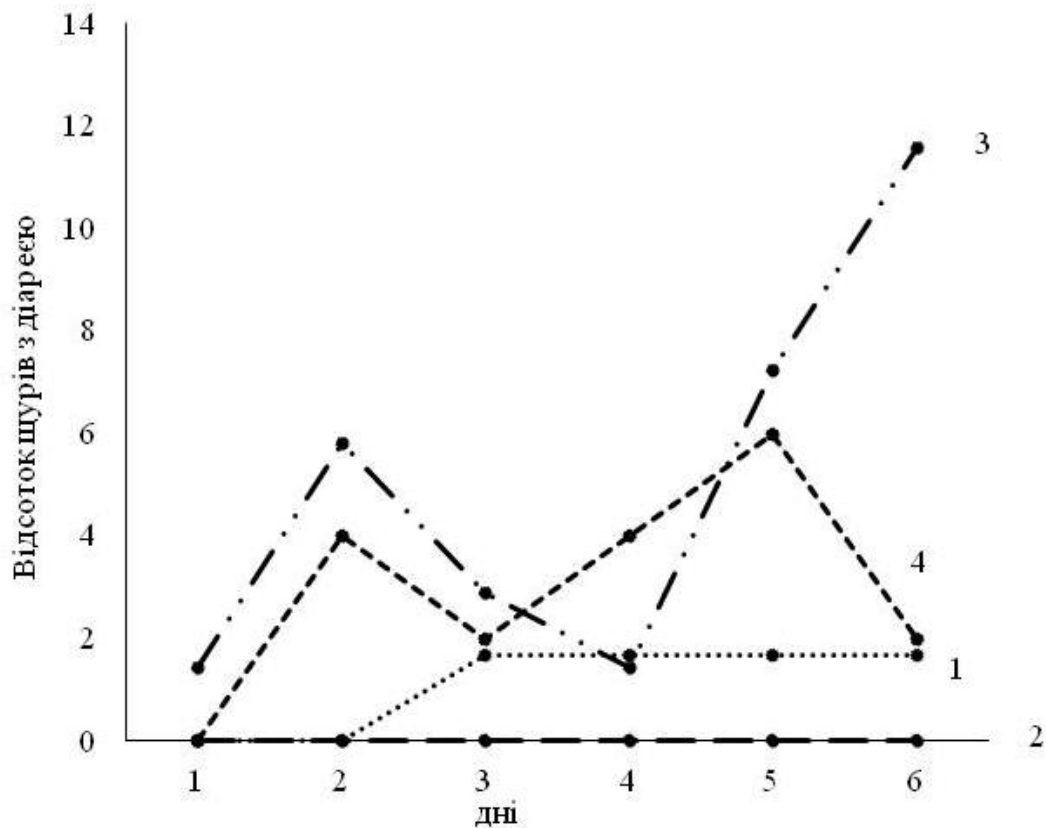


Рис. 4.11. Розвиток діареї у контрольній групі щурів на тлі 5-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг в.м. та його сумісного введення з лоратадином (1,7 мг/кг, *per os*):

1 – вода; 2 – лоратадин; 3 – цефтріаксон; 4 – цефтріаксон+лоратадин.

5-добове введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг викликало діарею у 6-12% щурів, тоді як на фоні лоратадину – лише у 2-4%. Ці зміни супроводжувалися підвищенням сумарного потоку води на 95,2 % (з $59,39 \pm 86,26$ до $115,91 \pm 67,38$ мкл/хв*г) ($p < 0,01$) та секреції K^+ на 34,2 % (з $-0,69 \pm 0,32$ до $-0,94 \pm 0,41$ мкмоль/хв*г) ($p < 0,01$), порівняно з дією самого цефтріаксону, та не впливало на потік Na^+ та Cl^- (рис. 4.12).

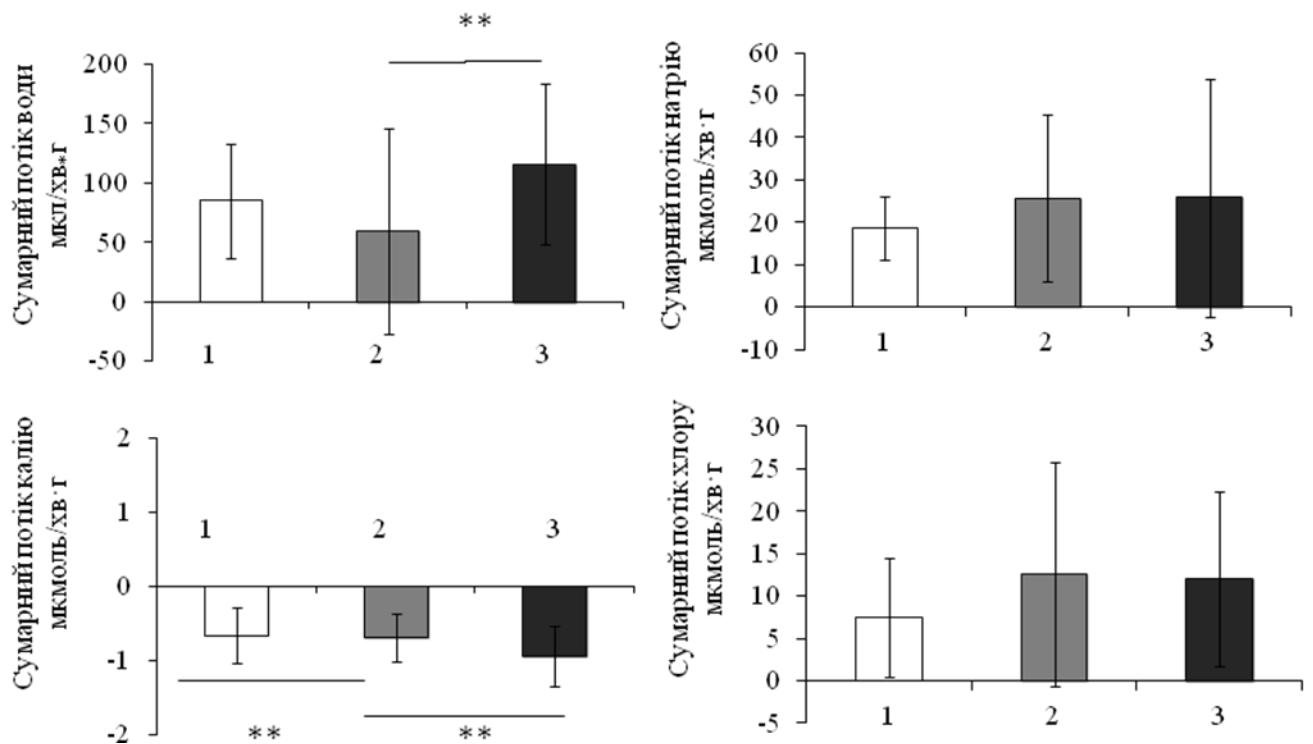


Рис. 4.12. Сумарний потік води та йонів натрію, калію, хлору після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово) та лоратадину (1,7 мг/кг, *per os*, n=5), (M±SD):

1 – лоратадин (n=3); 2 – цефтріаксон (n=5); 3 – цефтріаксон і лоратадин (n=5);

** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

В дослідженнях на ізольованій ділянці дистального відділу товстої кишки щурів, гістамін дозо-залежно підвищував секреторний потенціал

епітелію через вплив на хлорні і калієві канали апікальної мембрани та калієві канали на базолатеральній мембрані. Цей ефект не залежав від вивільнення нейротрансмітерів чи простагландинів [153]. Активація H₁-гістамінових рецепторів посилювала секрецію йонів хлору через епітелій товстої кишки мурчаків, і цей ефект залежав від рівня простагландинів та інтактного стану ентеральних нейронів [95-96]. Непрямий шлях впливу гістаміну на транспортну функцію епітелію товстої кишки може бути опосередкованим через метаболічне перетворення ейкозаноїдів [95, 113, 160].

Таким чином, гістамін здійснює просекреторний вплив на епітелій товстої кишки *in vitro*, але й досі залишається невідомим шлях дії гістаміну на транспорт води та електролітів у товстій кишці щурів *in vivo*, адже всі перераховані дослідження були зроблені на ізольованих препаратах, як і дослідження впливу антибіотиків на транспорт води та електролітів. В умовах *in vivo* гістамін викликав посилення секреції води, натрію, калію, але не викликав змін у транспорті хлору, як і в дослідах з 5-добовим введенням цефтріаксону, що свідчить про відмінність механізмів дії цефтріаксону *in vivo* від дослідів *in vitro* і в які, як доводять результати наших досліджень, залучаються гістамін та H₁-гістамінові рецептори.

Таким чином, ААД, викликана цефтріаксоном, може бути опосередкована, принаймні частково, вивільненням з тучних клітин гістаміну, ефект якого спрямований аналогічно до дії цефтріаксону: зниження рівня всмоктування води та натрію, та секреції калію. А блокада H₁-гістамінових рецепторів лоратадином попереджала дію цефтріаксону на потік води та калію. Отже, при призначенні антибіотиків у клінічній практиці може бути доречним призначення антигістамінних препаратів не лише для запобігання алергічним реакціям, які часто супроводжують прийом антибіотиків, але й для попередження розвитку діареї.

Висновки

1. Експресія Na⁺/H⁺ обмінника (NHE3/Slc9a3) не змінювалася після 5-добового введення цефтріаксону та збільшувалась після 14-добового

введення цефтріаксону порівняно з контрольною групою. Експресія електрогенних натрієвих каналів ENaC/Scnn1b знижувалася після 5-добового введення цефтріаксону, та, навпаки, збільшувалася після 14-добового введення цефтріаксону, відносно показників в контрольній групі. Експресія електрогенного хлорного каналу CFTR збільшувалася, відповідно після 5- та 14-добового введення цефтріаксону. Рівень протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону змін не було. Протилежна картина спостерігалась після 14-добового введення цефтріаксону рівень AQP8 зменшувався. Введення антибіотику азитроміцину зумовлювало підвищення рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки.

2. Введення цефтріаксону впродовж 5-ти днів призводило до зменшення секреції слизу та його збільшення після 14-ти добового введення.

3. Дані морфометрії свідчать про те, що достовірно збільшується товщина слизової оболонки і глибина кишкових крипт, а також площа поперечного перерізу ядер ентероцитів. Антибіотик цефтріаксон призводить до збільшення кількості келихоподібних клітин. При інтраперитонеальному введенні гістамін в дозах 1,8; 3,6 та 7,2 мг/кг не викликав статистично значущих змін транспорту води через епітелій товстої кишки щурів. Навпаки, внутрішньовенне введення гістаміну в дозі 3,6 мг/кг*год викликало зменшення абсорбції води, а, в деяких випадках, навіть реверсію абсорбції на секрецію. Також спостерігалось вірогідне зниження всмоктування йонів натрію та секреції калію.

4. При сумісному введенні цефтріаксону та блокатора H1-гістамінових рецепторів лоратадину спостерігається підвищення сумарного рівня всмоктування води та секреції йонів калію порівнянні з групою, яка отримувала цефтріаксон. Щодо сумарного потоку натрію та хлору достовірних змін ми не спостерігали.

РОЗДІЛ 5

ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ ПРОБІОТИКІВ У ПОПЕРЕДЖЕННІ ПОРУШЕНЬ ТРАНСПОРТУ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКІВ

Враховуючи той факт, що антибіотикотерапія викликає серйозні порушення в складі мікрофлори товстої кишки, а також відомостей про прямий ефект біфідобактерій [161] та лактобактерій [162] на транспорт йонів епітеліальними клітинами, логічно припустити позитивний ефект пробіотиків в попередженні антибіотик-викликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки. Беручи до уваги комплексну складну взаємодію мікроорганізмів нормофлори людини, перспективним є застосування мультикомпонентних пробіотиків.

5.1 Вплив мультипробіотика на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

В нашій роботі ми використовували мультипробіотик, до складу якого входить біомаса живих клітин у вигляді «живої» (неліофілізованої) форми з симбіотичною асоціацією 14-24 штамів найбільш фізіологічних для людини бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9 у флаконі. Дослідження транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки показали, що 5-добове введення цефтріаксону призводило до зменшення всмоктування води на 52,5% ($p < 0,001$), йонів натрію на 71,2% ($p < 0,001$) та секреції калію на 133,9% ($p < 0,001$) відносно контролю. У той же час, не відбувалися зміни рівня всмоктування хлору (рис. 3.2). Отже, ефект

цефтріаксону співпадає з відомими даними про перебіг ААД [163].

5-добове введення мультипробіотику призводило до зменшення всмоктування води на 34,4 %. В контрольній групі цей показник становив $36,76 \pm 27,73$, в дослідній $12,63 \pm 34,35$ мкл/хв*г ($p < 0,001$), йонів натрію на 54,6 % з $18,87 \pm 18,55$ до $10,30 \pm 16,10$ мкмоль/хв*г ($p < 0,001$), зменшення секреції калію на 39,1% з $-1,38 \pm 0,76$ до $-0,54 \pm 0,94$ ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою. Сумарний транспорт йонів хлору залишався без змін (рис. 5.1). Тобто, мультипробіотик, сам по собі, спричиняє просекреторну дію на транспорт води та електролітів, аналогічно до дії антибіотику.

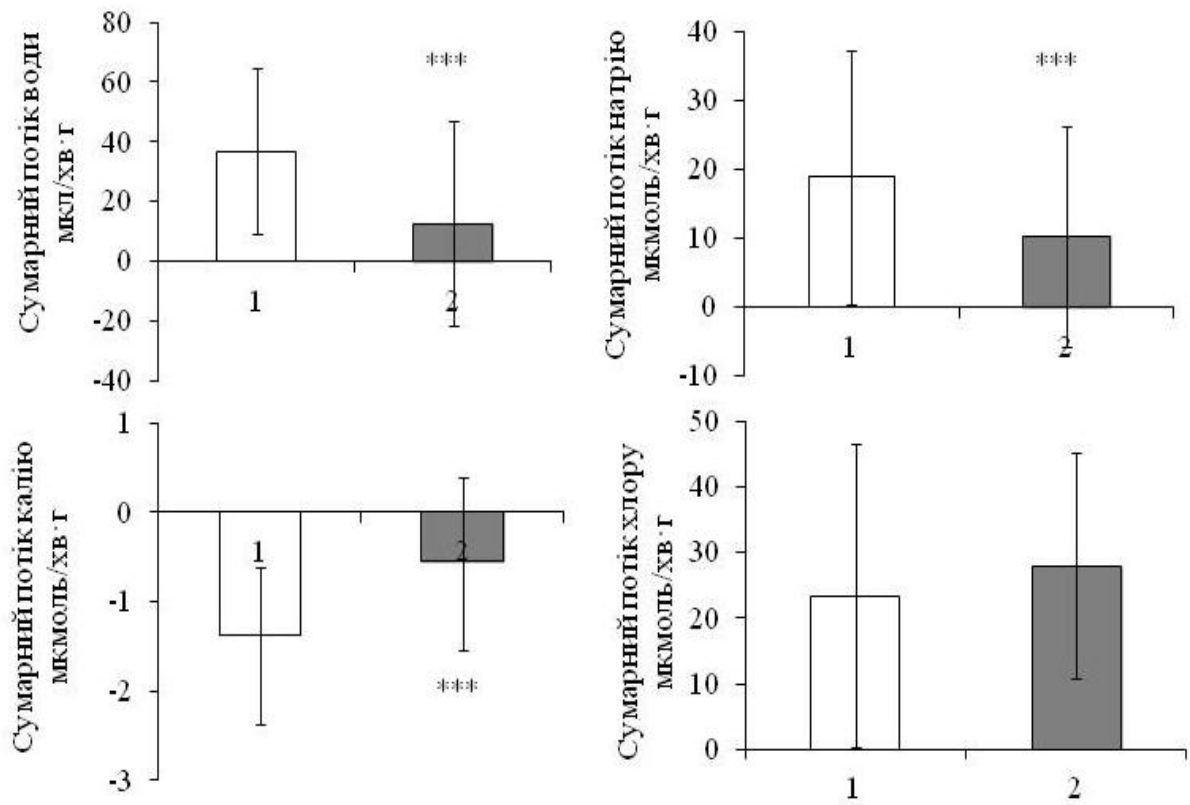


Рис. 5.1. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення мультипробіотику ($1,6 \times 10^9$ КУО/кг), ($M \pm SD$):

1 – вода (n=19); 2 – мультипробіотик (n=9);

*** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

При цьому, у тварин, яким впродовж 5 днів разом вводили антибіотик з мультипробіотиком, спостерігалось вірогідне збільшення рівня всмоктування води з $12,63 \pm 34,35$ до $29,87 \pm 19,82$ мкл/хв*г ($p < 0,001$) та натрію з $10,30 \pm 16,10$ до $17,02 \pm 20,71$ мкмоль/хв*г ($p < 0,001$) у порівнянні з групами, які отримували лише цефтріаксон чи мультипробіотик. В сумарному потоці калію достовірних змін, у порівнянні з групою щурів яким вводили лише мультипробіотик, ми не спостерігали (з $-0,54 \pm 0,94$ до $-0,66 \pm 0,48$ мкмоль/хв*г), проте у порівняння з групою яка отримала лише цефтріаксон відбувалось подальше зменшення секреції ($p < 0,001$). Сумарний транспорт йонів хлору залишився на вихідному рівні з $23,43 \pm 22,99$ до $17,6 \pm 14,85$ мкмоль/хв.*г (контроль) (рис. 5.2).

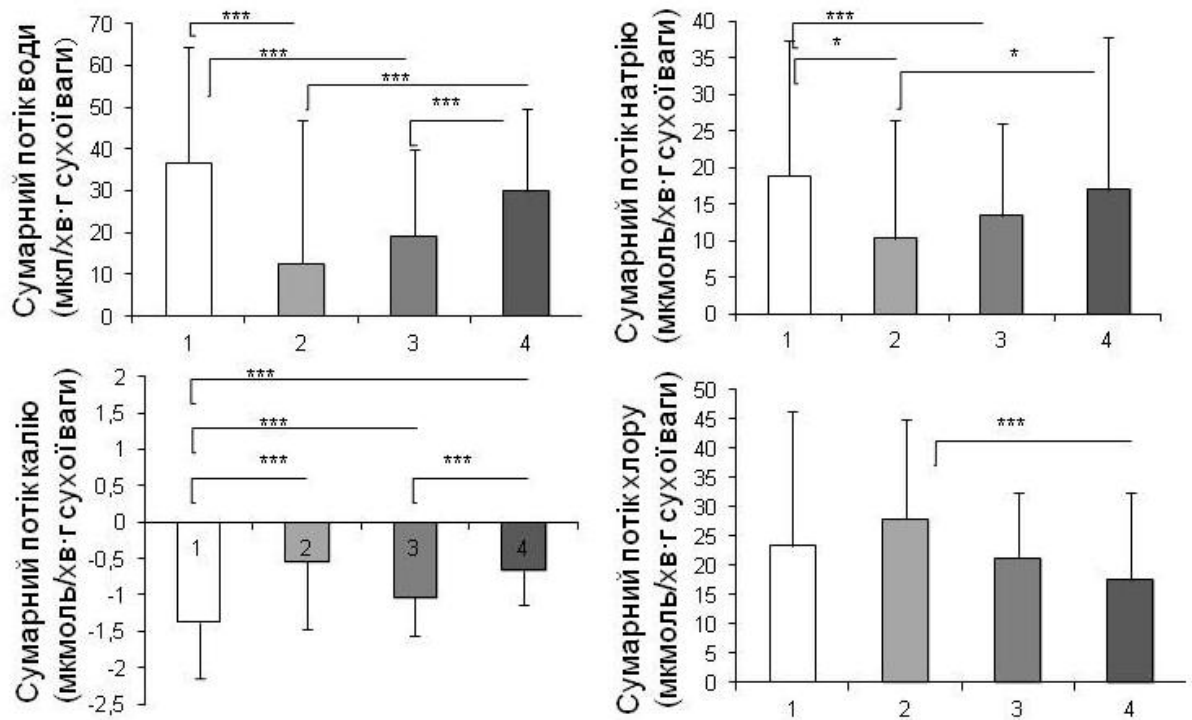


Рис. 5.2. Сумарний потік води та йонів (Na^+ , K^+ , Cl^-) через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з мультипробіотиком ($1,6 \times 10^9$ КУО/кг, *per os*) ($M \pm SD$): 1 – вода (n=19); 2 – мультипробіотик (n=9); 3 – цефтріаксон (n=14); 4 – мультипробіотик+цефтріаксон (n=6);

* – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Ми показали, що 14-, як і 5-добове введення цефтріаксону викликає зрушення у транспортній функції епітелію товстої кишки. Тому, важливо було дослідити ефекти мультипробіотику на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки за умов тривалого введення цефтріаксону, впродовж 14 днів.

Введення мультипробіотику впродовж 14 діб не викликало змін сумарного транспорту води через епітелій товстої кишки, але зменшувало рівень всмоктування натрію на 77,8% ($p < 0,05$), збільшувало рівень секреції калію на 183,0% ($p < 0,01$) та рівень всмоктування хлору на 224,4% ($p < 0,001$) (рис. 5.3).

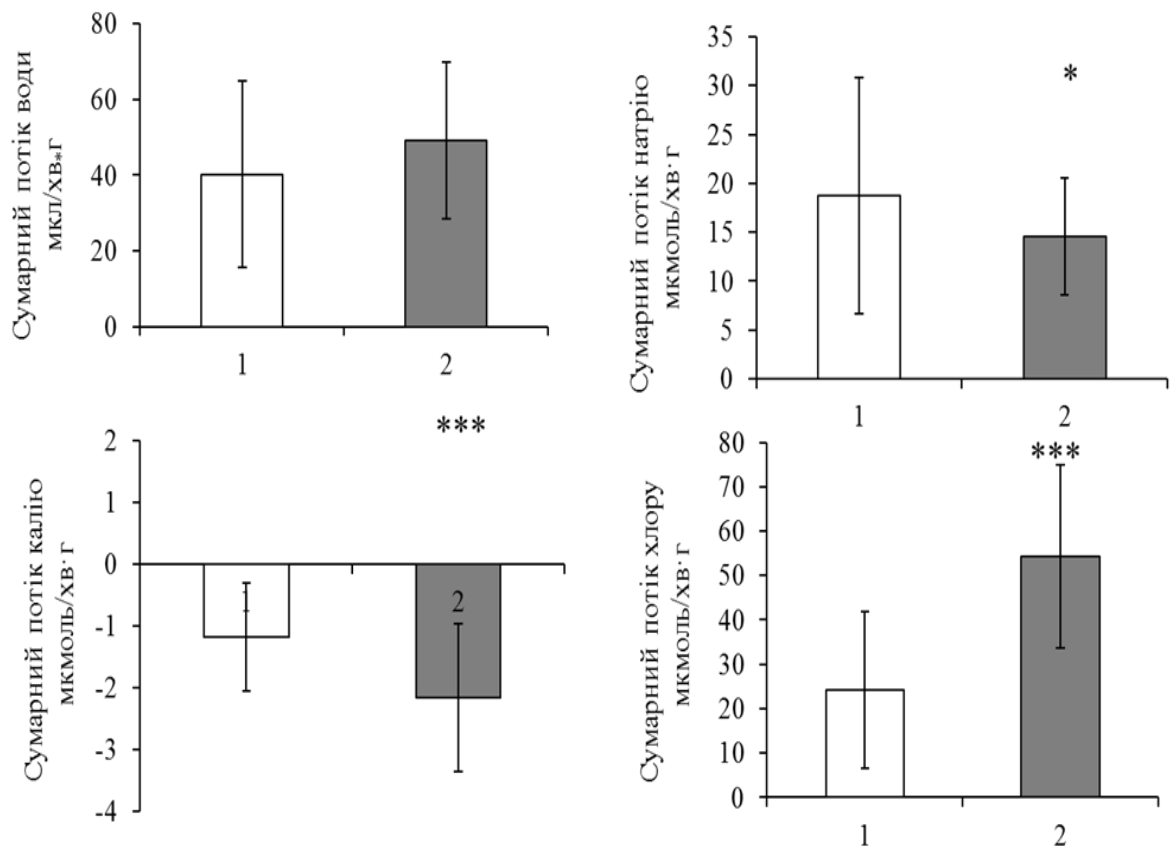


Рис. 5.3. Сумарний потік води та йонів (Na^+ , K^+ , Cl^-) через епітелій товстої кишки щурів після 14- добового введення мультипробіотику ($1,6 \times 10^9$ КУО/кг, *per os*) ($M \pm SD$):

1 – вода (n=9); 2 – мультипробіотик (n=6);

* - $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ відносно показників контрольної групи.

14-добове введення самого цефтріаксону зумовлювало зменшення рівня всмоктування води на 61,2 %, $p \leq 0,001$, йонів хлору на 72,5 %, $p \leq 0,05$ та секреції йонів калію на 65,2 %, $p \leq 0,001$. При цьому, значно зростала абсорбція йонів натрію на 159,7 %, $p \leq 0,001$ (рис. 3.4). Сумісне застосування антибіотику з мультипробіотиком впродовж 14 днів попереджало порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, викликане застосуванням цефтріаксону. Рівень всмоктування йонів натрію та секреції калію навіть були вищими за контрольні, відповідно на 140,4% ($p < 0,01$) та 157,6% ($p < 0,001$). А рівень всмоктування хлору порівняно з контрольною групою знизився в 50 разів ($p < 0,001$) (рис. 5.4)

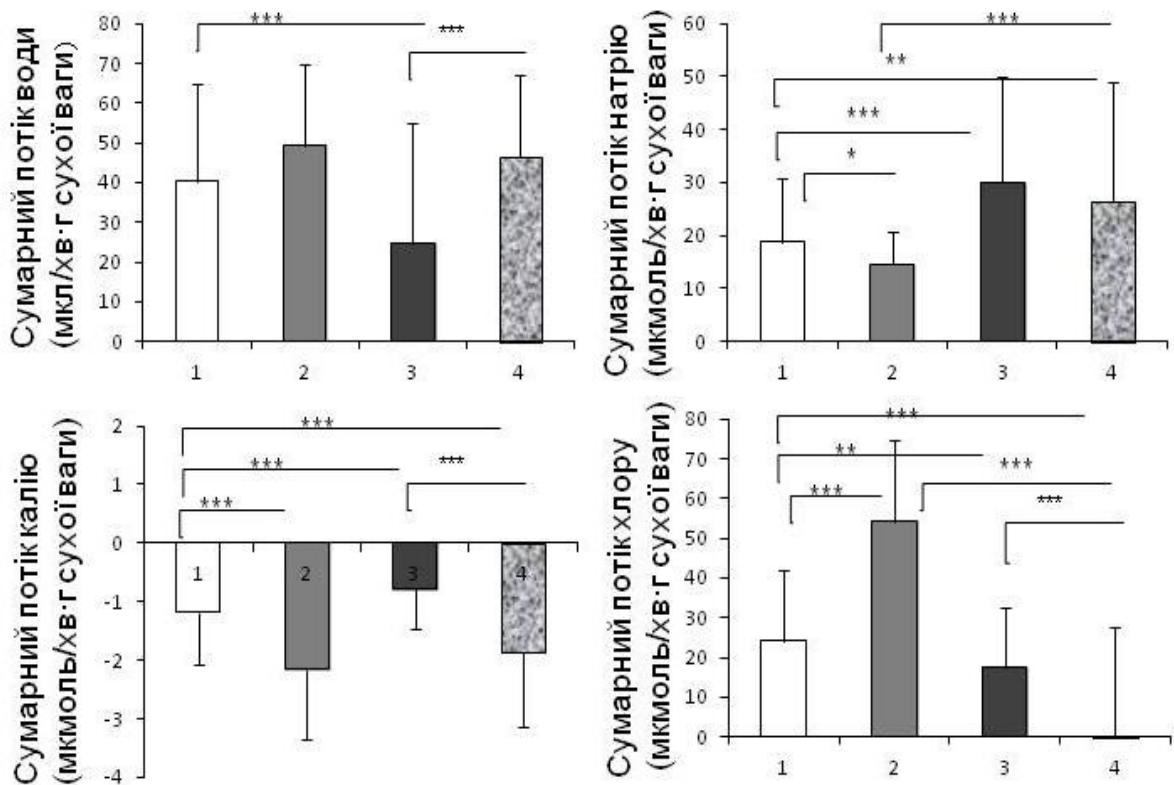


Рис. 5.4. Сумарний потік води та електролітів (Na^+ , K^+ , Cl^-) через епітелій товстої кишки щурів після 14- добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з мультипробіотиком ($1,6 \times 10^9$ КУО/кг, *per os*) ($M \pm SD$):

1 – вода (n=9); 2 – мультипробіотик (n=6); 3 – цефтріаксон (n=7); 4 – мультипробіотик+цефтріаксон (n=6);

* – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

Узагальнюючи отримані нами дані, можна зробити висновок, що 5-добове введення, як антибіотику цефтріаксону, так і мультипробіотику призводить до просекреторних змін сумарних показників транспорту води, натрію та калію через епітелій товстої кишки щурів. При подовженні терміну введення мультипробіотику до 14 діб просекреторний ефект зникав, тоді як ефект на антибіотик був аналогічним до результатів 5-добового введення антибіотику. При цьому, комбіноване введення мультипробіотику разом з цефтріаксоном зменшувало просекреторну дію останнього, як після 5- так і 14-добового введення антибіотику.

Аналізуючи отримані нами дані, можна припустити, що початкові зрушення у балансі нормофлори кишечника, будь-то в результаті застосування антибіотиків чи пробіотиків, сприймається організмом як зсув у гомеостазі. Тому діарея виникає як захисна реакція і можливо має запальну природу, зумовлену швидким вивільненням просекреторних медіаторів тучними клітинами. Інша ситуація після 14-добового введення, пробіотичні бактерії колонізують кишечник, і організм приходить до збалансованого співіснування з мікробіотою, тоді як антибіотик продовжує зрушувати цей баланс і навіть призводить до надмірного росту умовно-патогенних бактерій. Відповідно діарея через 14 днів це захисна реакція організму направлена на вимивання умовно-патогенних бактерій і зменшення їх контакту з епітеліальними клітинами слизової оболонки товстої кишки за рахунок збільшення секреції слизу.

5.2 Вплив сахароміцета на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

Для підтвердження ролі мікробіото-асоційованого розвитку прозапальних змін в епітелії товстої кишки, як фактору зрушень у

транспортній функції епітелію за умов ААД, ми провели дослідження з пробіотиком небактеріальної природи. *S. boulardii* проявляє здатність продукувати 54 кДа протеазу, яка безпосередньо інактивує токсини *C.difficile* і блокує епітеліальні рецептори для фіксації *C.difficile* [164]. Також *S. boulardii* стимулюють імунну відповідь до токсинів А і В *C.difficile* [164]. Виявлено, що *S. boulardii* здатні захищати клітини кишечника та печінки від токсичного впливу антибіотиків (наприклад, кліндаміцину), що проявлялося у зниженні рівня перекисного окиснення ліпідів, зменшенні інфільтрації нейтрофілів [165]. Крім цього, введення *S. boulardii* на тлі прийому кліндаміцину попереджало підвищення часу транзиту через кишечник, викликаного цим антибіотиком [165].

На фоні введення *S. boulardii* (Ентерола®250) кількість щурів з діареєю була меншою майже в 2 рази (рис. 5.5).

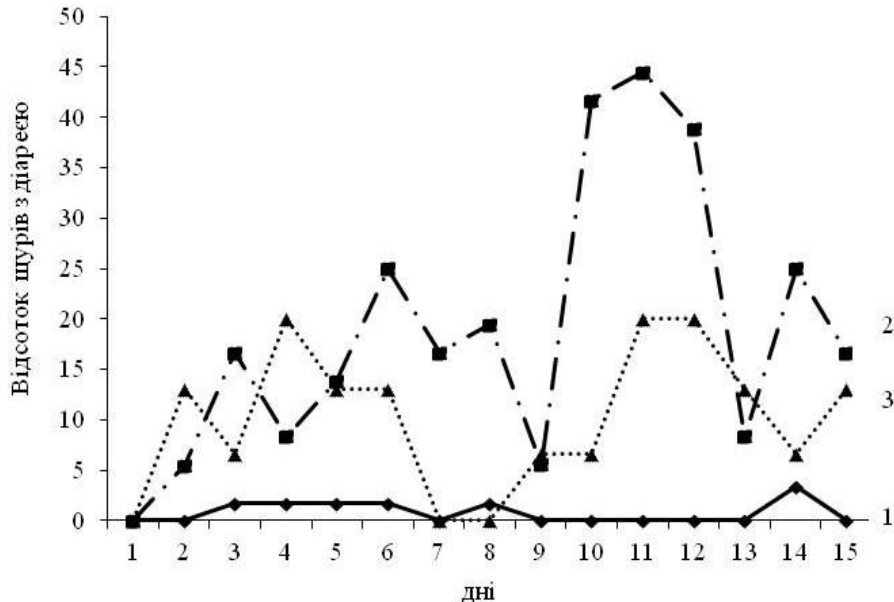


Рис. 5.5. Розвиток діареї у контрольної групи щурів на фоні введення цефтріаксону в дозі 300 мг/кг в.м. та комбінованого застосування цефтріаксону та *S. boulardii* (10 мг/доб):

1 – вода; 2 – цефтріаксон; 3 – цефтріаксон+ *S. boulardii*.

Ми вже зазначали, що антибіотик цефтріаксон призводить до появи м'якого стільця з другої доби, в середньому, у 25-30% щурів, а при комбінованій терапії цефтріаксону та *S. boulardii* цей показник в середньому дорівнював 10%.

При сумісному введенні цефтріаксону та *S. boulardii* протягом 5-добової терапії, навпаки, збільшувалося всмоктування води з $26,54 \pm 18,85$ до $62,55 \pm 40,70$ мкл/хв*Г ($p < 0,001$), натрію з $17,73 \pm 28,12$ до $29,62 \pm 23,74$ мкмоль/хв*Г ($p < 0,01$), хлору з $19,15 \pm 13,25$ до $38,38 \pm 13,66$ мкмоль/хв*Г ($p < 0,001$) та не змінювалась секреція калію з $-0,74 \pm 13,76$ до $-0,6 \pm 0,25$ мкмоль/хв*Г (рис. 5.6).

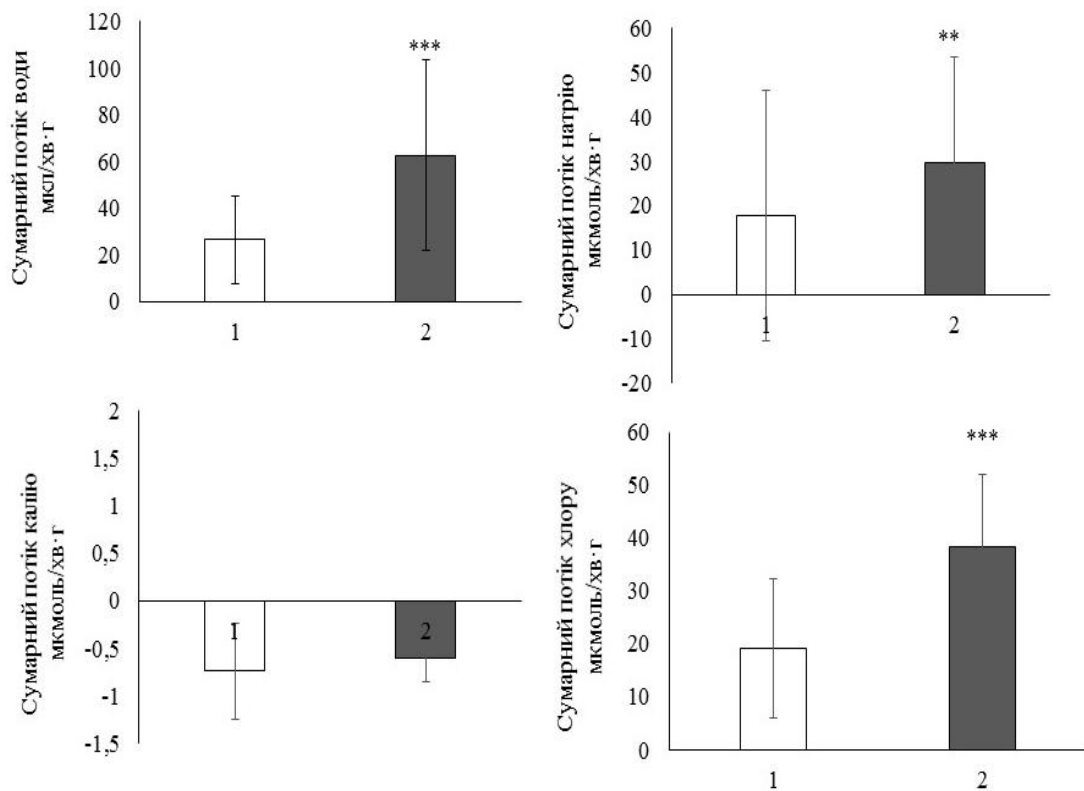


Рис. 5.6. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з *S. boulardii* (10 мг/добу), (M±SD):

1 – цефтріаксон (n=7); 2 – цефтріаксон+S. boulardii (n=8);

* – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

При 14-добовій терапії *S. boulardii* та цефтріаксону сумарний транспорт води не змінювався (з $40,27 \pm 24,68$ до $42,96 \pm 27,64$), але зменшувалися показники сумарного току натрію з $18,76 \pm 12,05$ до $14,59 \pm 7,88$ та хлору з $24,17 \pm 17,69$ до $13,96 \pm 21,39$, збільшувалася секреція калію з $-1,18 \pm 0,88$ до $-2,02 \pm 1,14$, порівняно з контрольною групою (рис. 5.7).

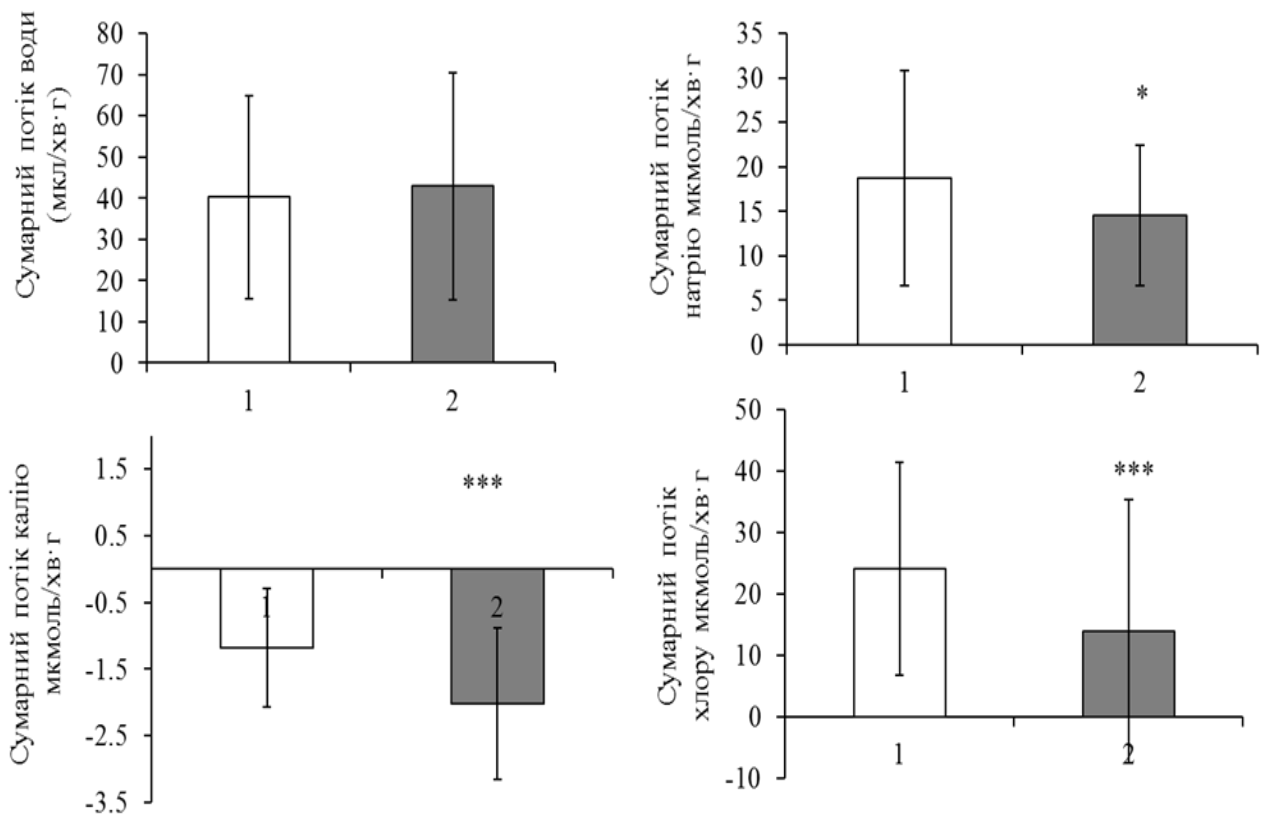


Рис. 5.7. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з *S. boulardii* (10 мг/добу), (M±SD):

1 – вода (n=9); 2 – цефтріаксон+ *S. boulardii* (n=6);

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

Порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон, збільшувалася секреція калію з $-1,26 \pm 0,85$ до $-2,02 \pm 1,14$, а показники транспорту води, йоннів натрію та хлору наближались до вихідних значень (рис. 5.8).

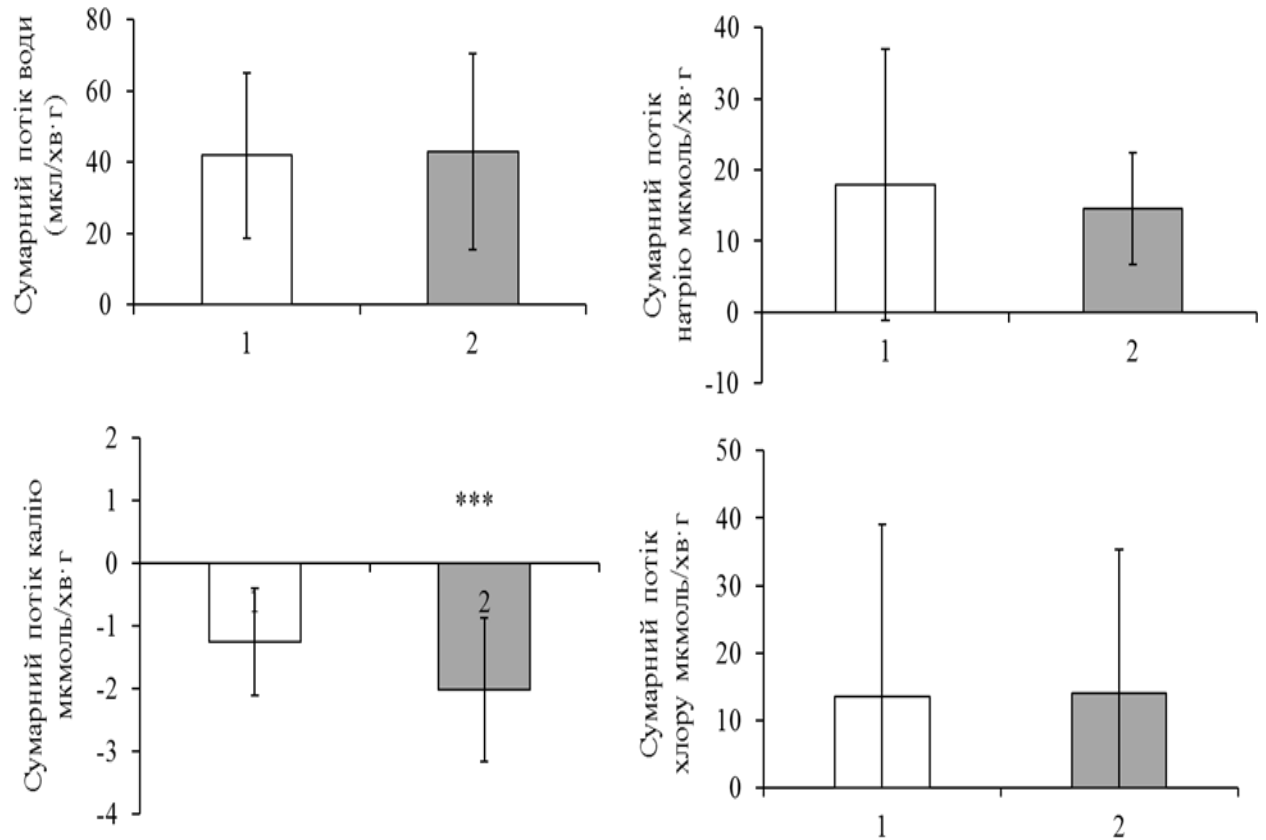


Рис. 5.8. Сумарний потік води, йонів натрію, калію та хлору через епітелій товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з *S. boulardii* (10 мг/добу):

1 – цефтріаксон (n=5); 2 – цефтріаксон+S. *boulardii* (n=6);

*** – $p < 0,001$ відносно показників у дослідній групі.

Враховуючи, що транспорт води здійснюється переважно пасивно за осмотичним градієнтом, створеним транспортом йоннів, збільшення секреції йоннів хлору колоноцитами супроводжується виходом води в порожнину кишечника і сприяє розвитку діареї. У товстій кишці секреція хлору

здійснюється через цАМФ-залежні (CFTR) і кальцій-активованні (CaCC) хлорселективні канали. D. Czerucka з співавт. (1999) виявили, що *S.boulevardii* здатні пригнічувати секрецію хлору, викликану холерним токсином, як через CFTR канали, так і через CaCC канали [166]. Ми також встановили, що додавання *S.boulevardii* (Ентерол®250) запобігало змінам транспорту хлору, викликаним цефтріаксоном, і попереджало розвиток діареї. Крім безпосереднього впливу на хлорселективні канали, *S.boulevardii* здатні попереджати розвиток ААД за рахунок пригнічення росту патогенних мікроорганізмів і підтримки нормобіоти кишечника. Коротколанцюгові жирні кислоти, які утворюються при розщепленні вуглеводів нормобіоти кишечника, посилюють всмоктування хлору через активацію СГ/КЛЖК і HCO_3^- /КЛЖК обмінників, що також попереджає розвиток діареї.

Таким чином, використання *S.boulevardii* (Ентерол®250) на фоні антибактеріальної терапії цефтріаксоном є патогенетично обґрунтованим методом профілактики розвитку ААД, що підтверджується численними клінічними і експериментальними даними [164-165, 167].

Висновки

1. П'ятидобове введення мультипробіотику призводило до зменшення всмоктування води, йоннів натрію, секреції калію. Сумарний транспорт йоннів хлору залишався без змін. При сумісному застосуванні антибіотику з мультипробіотиком, спостерігалось вірогідне збільшення рівня всмоктування води та натрію. В сумарному потоці калію порівняно з групою, якій вводили сам цефтріаксон, достовірних змін ми не спостерігали. Сумарний транспорт йоннів хлору залишився на вихідному рівні. Введення мультипробіотику впродовж 14 діб не викликало змін сумарного транспорту води через епітелій товстої кишки, але зменшувало рівень всмоктування натрію, калію та збільшувало рівень всмоктування хлору. Сумісне застосування антибіотику з мультипробіотиком впродовж 14 діб збільшувало рівень всмоктування

йоннів натрію та секрецію калію. А рівень всмоктування хлору порівняно з контрольною групою знизився в 50 разів.

2. При сумісному введенні цефтріаксону та ентеролу протягом 5-добового введення, навпаки, збільшувалося всмоктування води, натрію, хлору та не змінювалась секреція калію. При 14-добовій терапії Ентеролу®250 та цефтріаксону, збільшувалася секреція калію, зменшувалися показники хлору порівнянно контрольною групою. Порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон, збільшувалася секреція калію, показники транспорту води, йоннів натрію та хлору наближались до вихідних значень.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Антибактеріальна терапія посідає значне місце у лікуванні хворих всіх вікових категорій. Часто від ефективності та своєчасності цієї терапії залежить життя пацієнта. Нажаль, окрім переваг, антибактеріальна терапія має і побічні ефекти. Найбільш поширеними побічними реакціями, які пов'язані із застосуванням антибактеріальних препаратів, є зміни з боку шлунково-кишкового тракту, які спостерігаються у 3-53 % хворих [168-169]. Ці зміни порушують самопочуття хворого, продовжуючи період непрацездатності на термін від 5 до 14 днів.

Дуже часто, виснажуюча діарея - це саме та ціна, яку ми повинні платити за ефективність антибіотиків. ААД – це три чи більше епізодів неоформлених випорожнень протягом двох та більше днів, які з'явилися на фоні застосування антибіотиків чи протягом 8 тижнів після їх відміни [26].

Основним фізіологічним бар'єром на шляху виникнення діареї є товста кишка, всмоктувальна спроможність якої досягає 6 л води за добу і лише у випадку її підвищеного надходження виникає діарея [1]. Сумарна всмоктувальна здатність епітелію товстої кишки регулюється добре збалансованими процесами абсорбції та секреції електролітів, порушення якого призводить до діареї. Основне всмоктування води через епітелій товстої кишки відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється транспортом електролітів, переважно, хлориду натрію, за рахунок дифузії (міжклітинний шлях). Також, часткове всмоктування відбувається трансцелюлярно за допомогою аквапоринових каналів, переважно AQP8, вбудованих у мембрани колоноцитів [170]. Важливу роль в регуляції сумарного транспорту йоннів через епітелій товстої кишки відіграють цАМФ-залежні хлор-селективні канали - трансмембранний регулятор муковісцидоза (CFTR) [66]. Зміни в їх активності призводять до порушення всмоктування натрію через електрогенні натрієві канали (ENaC)

та Na^+/H обмінник NHE3 , що призводить до зсуву напрямку транспорту через епітелій товстої кишки у бік секреції [66, 132]. Більш того, стимуляція секреції хлору через CFTR канали – є центральним механізмом ентеротоксин-викликаної діареї [171].

На сьогодні дані щодо механізмів впливу антибіотиків на транспортну функцію епітелію кишечника дуже обмежені та залишаються на рівні припущень та гіпотез.

Одним із механізмів діареї за дії різних груп лікарських препаратів є прямий вплив на всмоктувальну функцію епітелію кишечника. Так бісакоділ– чи мізопростол–викликана діарея зумовлені активацією аденілатциклази ентероцитів з наступною стимуляцією активної секреції йонів Cl^- , HCO_3^- , пасивного відтоку йонів Na^+ , K^+ та води. Блокада АТФази дігоксином, ауранофіном, колхіцином чи олсалазіном викликає діарею через пригнічення активності Na^+ , K^+ -насосу [172]. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі ААД, з огляду на механізм дії різних груп антибіотиків, не досліджували, хоча існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну функцію епітелію [172].

Антибіотики широкого спектру дії ряду макролідів та цефалоспоринів є найбільш вживаними в клінічній практиці. За механізмом дії цефалоспорини мають бактерицидний ефект, а макроліди - бактеріостатичний [11].

Макроліди мають макроциклічне лактонне кільце (макролідне кільце), яке з'єднане з одним або кількома вуглеводневими залишками. В залежності від числа атомів вуглецю, які входять до складу лактонного кільця, макроліди поділяються на 12-, 14-, 15-, 16- та 17-членні. Препарати групи макролідів порушують синтез білку, що призводить до пригнічення розмноження і зниження вірулентності мікробних клітин, через зворотне зв'язування з каталітичним пептидил-трансферазним центром 50S-субодиниці рибосом [173].

Цефалоспори́ни – ряд природних і напівсинтетичних антибіотиків, які представляють собою біциклічні з'єднання, що складаються з β -лактамних і дигідротіазинового кілець. Обидва кільця утворюють 7-аміноцефалоспоринову кислоту - загальне ядро молекули цефалоспоринів. Цефалоспори́ни пригнічують синтез клітинної стінки бактерій, що викликає загибель бактерій в результаті осмотичного лізису [129].

За даними літератури, при призначенні цефалоспоринів діарея виникає у 4-9 % випадків, а макролідів - 2-5 % [16].

Нами встановлено, що на 2-й день після введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг діарея розвивалась у 6% тварин. На 4-й день цей показник падав до 0%. На 6-й день - знов збільшувався до 12%. На 12-й день ми спостерігали зменшення числа тварин з діареєю до 6-7%.

50 мг/кг – це клінічна доза для цефтріаксону. Ми прийняли до уваги той факт, що при розрахунку еквівалентної дози препаратів враховується коефіцієнт відносної площі поверхні тіла, для щурів він дорівнює 6. Тому наступним етапом нашої роботи була перевірка впливу цефтріаксону в дозі 300 мг/кг на клінічні прояви діареї. Збільшення дози цефтріаксону до 300 мг/кг викликало діарею у більшого числа тварин, проте характер її перебігу був аналогічний до дози 50 мг/кг, що свідчить про транзиторний перебіг ААД на тлі введення цефтріаксону. Далі ми перевірили наскільки клінічні прояви діареї пов'язані зі змінами у транспортній функції епітелію товстої кишки щурів за дії різних груп антибіотиків. Введення цефтріаксону впродовж 5 діб в дозі 50 мг/кг викликало зменшення всмоктування води на, Na^+ , рівня секреції K^+ . Рівень всмоктування Cl^- не змінювався. Цефтріаксон в дозі 300 мг/кг призводив до зменшення сумарного рівня всмоктування води, Cl^- , секреції K^+ . Рівень всмоктування Na^+ не змінювався.

Таким чином, спостерігались односпрямовані ефекти між дозами 50 та 300 мг/кг на транспорт води, обидві дози викликали її зменшення.

В клінічній практиці, при лікуванні важких інфекційних захворювань, наприклад, менінгіту [120], збільшується тривалість курсу антибіотикотерапії

з 5 до 14 днів. Введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг впродовж 14 діб зумовлювало вірогідне зниження рівня всмоктування води, Cl^- , секреції K^+ та збільшення всмоктування Na^+ . Введення щурам цефтріаксону в дозі 300 мг/кг впродовж 14 днів викликало зменшення сумарного потоку Cl^- та незначне збільшення секреції K^+ . Щодо сумарного потоку води та Na^+ статистично вірогідних змін у показниках не було.

Отже, отримані результати вказують на зміни у рівні сумарного току йонів хлору в залежності від збільшення тривалості введення антибіотику та підвищення його дози. Відомо, що збільшення секреції Cl^- через CFTR канали є ключовим механізмом секреторної діареї [79]. З іншого боку, секреція Cl^- необхідна для «вимивання» умовно-патогенної флори з поверхні кишечника та відновлення слизового бар'єру [187]. Нашими колегами було встановлено зрушення у складі пристінкової мікробіоти кишечника щурів, але не зафіксовано росту патогенної мікробіоти після введення цефтріаксону впродовж 5-14 днів, що свідчить на користь отриманих нами даних.

Пероральне введення іншого антибіотику цефалоспоринового ряду цефіксиму не викликало діареї у щурів. При цьому спостерігалось навіть збільшення всмоктування води та Cl^- . Сумарний потік K^+ вірогідно не змінювався, проте сумарний потік Na^+ знижувався.

Пероральне введення макролідів азитроміцину також не викликало діареї у щурів. Проте, спостерігались значні зміни у показниках сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів. Так, збільшувалось всмоктування води, Na^+ та Cl^- . Секреція K^+ , навпаки, зменшувалася.

Отже, ефекти викликані цефіксимом та азитроміцином, які на відміну від цефтріаксону вводили перорально, відрізняються від останнього. Це дозволяє припустити, що механізм ААД може залежати не лише від природи антибіотичної дії, але і від шляху введення антибіотику. На користь нашого припущення є ретроспективні дослідження [174], в яких встановлено, що

інтраперитонеальне введення антибіотиків, на відміну від перорального, в 4 рази підвищує ризик розвитку побічних ефектів, зокрема діареї.

Узагальнена таблиця сумарних потоків води та йонів через епітелій товстої кишки щурів за дії парентерального антибіотику цефтріаксону

Сумарний потік	Цефтріаксон	
	50 мг/кг	300 мг/кг
	5-добове введення	
Вода	↓	↓
Na+	↓	без змін
K+	↓	↓
Cl-	без змін	↓
	14-добове введення	
Вода	↓	без змін
Na+	↑	без змін
K+	↓	↑
Cl-	↓	↓

Згідно ранніх досліджень антибіотиків мають пряму дію на транспорт рідини через епітелій кишечника [11, 12, 109]. Перфузія кишки антибіотиком групи лінкозамідів кліндамицином помітно пригнічувала всмоктування води

Узагальнена таблиця сумарних потоків води та йонів через епітелій товстої кишки щурів за дії пероральних антибіотиків цефіксиму та азитроміцину

Сумарний потік	Цефіксим	Азитроміцин
	10 мг/кг	15 мг/кг
	7- добове введення	5-добове введення
Вода	↑	↑
Na+	↓	↑
K+	↓	↓
Cl-	↑	↑

та призводила до секреції в умовах *in vivo* в дослідях на клубовій, тощій та товстій кишках. Автори не змогли розкрити механізм кліндаміцинівкліканих порушень транспортної функції епітелію проте показали, що цАМФ або цГМФ збільшували проникність слизових оболонок та не впливали на морфологію слизової оболонки [12]. Дослідження впливу антибіотиків групи лінкозамідів, кліндаміцину і лінкоміцину; групи макролідів еритроміцину; групи аміноглікозидів гентаміцину; бета-лактамного антибіотику ампіциліну; і глікопептидного антибіотику ванкоміцину на транспорту іонів через епітелій дистального відділу товстої кишки кроля встановили їх різнонаправлений вплив. Кліндаміцин, еритроміцин, гентаміцин і лінкоміцин пригнічували відповідь епітелію та електростимуляцію. Кліндаміцин і лінкоміцин знижували базальний активний ток йонів через епітелій та епітеліальну відповідь на ацетилхолін. Ванкоміцин підсилював секреторну дію простагландину E2. У той час як ампіцилін не впливав на транспортну функцію епітелію [79]. Дослідження на культурі епітеліальних клітин товстої кишки людини показали пряму дію двох пептидних антибіотиків, дураміцину

і Ro 09-0198 на апікальну мембрану клітин. Антибіотики викликали збільшення транспорту іонів через підвищення регуляції електрогенних транспортерів натрію (ENaC) [13].

У нашому дослідженні ми використовували парентеральний шлях введення антибіотика, що виключало прямий вплив антибіотика на епітеліальні клітини. Незважаючи на це, ми спостерігали значні зміни в транспорті води і йонів (Na^+ , Cl^- і K^+) через епітелій товстої кишки щурів *in vivo*.

Всмоктування води відбувається в товстій кишці пасивно через міжклітинні проміжки за градієнтом концентрації йонів і полегшеною дифузією через спеціальні канали - аквапорини (наприклад, AQP8).

В епітелії товстої кишки існує два шляхи всмоктування електролітів: електронейтральний (в основному, за рахунок Na^+/H^+ обмінників для Na^+ і $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ для Cl^-) і електрогенний (через ENaC). Електрогенна секреція Cl^- через канали CFTR є однією з основних причин секреторної діареї [175].

Нещодавні дослідження показали, що як патогенні, так і симбіотичні бактерії можуть безпосередньо впливати на транспорт води через епітелій кишечника за рахунок регуляції йонних транспортерів [176-177].

Інфекція *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*), яка за функціональними характеристиками відповідає такій ентеропатогену *E. coli*., призвела до підвищення експресії CFTR, DRA і NHE3 транспортерів у мишей дикого типу [178]. Пероральне введення *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, кишкового-патогену, який викликає діарею у здорових людей, знижувало експресії DRA, ENaC і викликало інтерналізацію CFTR на культурі клітин епітелію товстої кишки мишей [179]. Інкубація епітеліальних клітин кишечника лінії T84 з різними штамами *E. coli* (патогенними, коменсалами, пробіотичними та штучними штамами) значно знижувало цАМФ-залежну секрецію йонів. Цей патоген-індукований стан гіпосекреції супроводжувався значним зниженням експресії аніонного каналу CFTR на апікальній поверхні клітин [180].

Пробіотичні мікроорганізми (наприклад, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) мають модулюючий ефект при інфекціях шлунково-кишкового тракту і стрес-індукованого запалення [181]. Біфідобактерії знижували карбахол-індуковану і в меншій мірі Fsk-індуковану секрецію СІ в НТ29-19А епітеліальному моношарі [182]. *Lactobacillus acidophilus* значно посилював обмін СІ/НСО₃⁻ за рахунок збільшення кількості аніонних обмінників DRA на апікальній поверхні в умовах *in vitro* та *in vivo*. Описані дані можуть потенційно пояснювати антидіарейний ефект даних мікроорганізмів [183].

Нашими колегами встановлено, що після прийому цефтріаксону на 5 і 14 день знижувалась активність анаеробних *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* у фекальних посівах щурів, але ці зміни були в межах норми. Чисельність аеробних умовно-патогенних ентеробактерій (*Citrobacter SPP*, *Kleibsellia SPP*, *Proteus SPP*) і золотистого стафілокока значно зростала протягом 5 днів після введення цефтріаксону і поверталася до початкового рівня після 14 днів. Зменшувалась загальна кількість *E. coli*, після прийому цефтріаксону на 5 і 14 день, в основному, за рахунок зменшення середньої кількості лактози (+) *E. coli* [186]. Вплив антибіотиків на кишечник викликає вторинні зміни травної функції по відношенню до зниження концентрації нормальних кишкових бактерій, або викликають розмноження патогенних бактерій [184-185].

В нашій роботі ми спостерігали значне виснаження слизового шару після 5 днів введення цефтріаксону та збільшення секреції слизу після 14 днів, в ті ж часові періоди, що і зазначені зміни в складі мікробіоти.

Вважається, що динамічні зміни товщини і складу слизового шару на поверхні епітеліальних клітин є захисним механізмом організму від патогенних уражень. В літературі описано, що інфікування *S. rodentium* викликає зміни товщини слизового шару в експлантах тканини. Стадія найбільшого потовщення збігається з початком зменшення кількості бактерій на 14 день після зараження. Крім того, шар слизу, який завжди присутній на поверхні здорової товстої кишки, ледве виявлявся у період загострення

інфекції (через 10 днів після зараження), але потім відновлювався, хоча і в менш структурованому вигляді [187].

Перенесення *E. coli* з вмісту кишечника звичайних дитинчат щурів до організму стерильних дорослих щурів призводило до швидкого виснаження слизу келихоподібних клітин. Кількість муцину поступово поверталася до початкового рівня, що було пов'язано із зростанням KLF4 і білків-інгібаторів клітинного циклу p21 і p27 [188]. В обох дослідженнях [187-188] зміни в шарі слизу супроводжувалися секрецією йонів, змінами в активності йонних транспортерів і експресії водних каналів. Як правило, секреції рідини через епітелій кишечника спрямована на «вимивання» потенційно патогенів або шкідливих речовин, таких як токсини [177]. Просекреторні зміни дозволяють реструктуризувати шар слизу на поверхні епітеліальних клітин, витісняючи патогени до зовнішнього шару слизу, де їх потім витісняє відновлена симбіотична флора [187].

В наших дослідженнях 5-добове введення цефтріаксону викликало просекреторні зміни в епітелії товстої кишки, що супроводжувалось вірогідним зменшенням секреції поверхневого слизу. На молекулярному рівні це супроводжувалось зниженням експресії мРНК електрогенних натрієвих каналів ENaC/Scnn1b, які відповідають за активне всмоктування йонів натрію; збільшенням експресії мРНК електрогенних хлорних каналів CFTR, які обумовлюють секрецію хлору. Експресія мРНК електронейтрального Na^+/H^+ обмінника (NHE3/Slc9a3) не змінювалась.

Прозапальні зміни в слизовій оболонці кишечника з подальшим залученням нейтрофілів і активацією прооксидантів є ключовим елементом у захисті від кишкових інфекцій та профілактиці зневоднення зі смертельними наслідками [191]. Відомо, що у пацієнтів на фоні дизбіотичних процесів, які розвиваються на фоні застосування антибіотиків, виникають прозапальні зміни в слизовій оболонці кишечника [192-194], що може, у свою чергу, викликати розлади транспортної функції епітелію.

Морфометричний аналіз гістологічних зразків товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону свідчить про виражений набряк і десквамацію епітелію та зменшення площі келихоподібних клітин, що характерно для процесу запалення.

Більш того, цитохімічний аналіз виявив зменшення в 2,4 раза кількості гранул тучних клітин (показник активації клітин) після введення цефтріаксону. Слід зазначити, що азитроміцин не викликав ніяких змін [198].

Як відомо, тучні клітини залучені до процесів запалення в кишечнику [195], дегрануляція тучних клітин під дією нейромедіаторів та цитокінів є маркером запального процесу [196]. Під час дегрануляції тучних клітин, окрім інших медіаторів запалення, вивільняється гістамін [197]. Підвищений рівень гістаміну був виявлений у просвіті шлунково-кишкового тракту пацієнтів з запальними захворюваннями кишечника [151-152]. Встановлено, що H1-гістамінові рецептори беруть участь у регуляції транспорту йонів хлору через епітелій товстої кишки [153], а гістамін є важливим просекреторним агентом [154].

Роль гістаміну та його рецепторів, зокрема H1-рецепторів, як потенційних чинників розвитку ААД не досліджувалась. Тому метою наступної серії наших досліджень було: 1) провести порівняльний аналіз зрушень у транспорті води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотику цефтріаксону та гістаміну; 2) з'ясувати роль H1-гістамінових рецепторів в механізмах цефтріаксон-викликаного діареї.

Ми показали, що при інтраперитонеальному введенні, гістамін в дозах 1,8; 3,6 чи 7,2 мг/кг не викликав статистично значущих змін в транспорті води через епітелій товстої кишки щурів.

Проте, внутрішньовенне введення гістаміну в дозі 3,6 мг/кг*год викликало статистично значуще зменшення абсорбції води через епітелій товстої кишки щура, а в деяких випадках, навіть, реверсію абсорбції на секрецію. Ефект розвивався через 60 хв після початку інфузії гістаміну і тривав впродовж всього періоду експерименту. Також, спостерігалось

вірогідне зниження всмоктування Na^+ та секреції K^+ вже через 40 хв від початку інфузії. Статистично вірогідних змін рівня всмоктування йонів Cl^- зареєстровано не було.

При внутрішньовенному введенні, на відміну від інтраперитонеального, одночасно створюється висока концентрація гістаміну в крові, яка характерна для запальних процесів. Отже, необхідні високі концентрації гістаміну, щоб викликати діарею.

За рівнем всмоктування води, Na^+ , K^+ ефект гістаміну співпадає з таким цефтріаксону, особливо, після його короткотривалого введення, що може опосередковано свідчити про можливу участь гістаміну в механізмах розвитку діареї на фоні введення цефтріаксону.

У досліджах на ізольованих препаратах товстої кишки людини Keely S.J. зі співав. [154] було показано, що саме H_1 , а не H_2 і H_3 -гістамінові рецептори опосередковують просекреторну дію гістаміну на транспорт електролітів через епітелій товстої кишки. Для перевірки гіпотези про те, що ефект цефтріаксону на транспорт води та електролітів пов'язаний з виділенням гістаміну з тучних клітин, була проведена серія експериментів із сумісним введенням цефтріаксону та блокатора H_1 -гістамінових рецепторів лоратадином (1,7 мг/кг, *per os*).

У результаті наших досліджень показано, що сумісне введення лоратадину з цефтріаксоном попереджає викликані цефтріаксоном клінічні прояви діареї у щурів. Так, за дії цефтріаксону діарея розвивалась у 6-12% щурів, тоді як на фоні лоратадину – лише у 2%. Ці зміни супроводжувались підвищенням сумарного рівня всмоктування води (на 95,2 %, $p < 0,01$) та секреції калію (на 42,4 %, $p < 0,01$), порівняно з дією самого цефтріаксону, та не впливало на транспорт натрію та хлору.

Ефект гістаміну на секреторну функцію кишечника може бути прямим і опосередкованим. Інкубація колоноцитів людини лінії T84 з гістаміном чи агоністом H_1 , але не H_2 -гістамінових рецепторів, стимулювала секрецію хлору. Цей ефект за механізмом схожий на ефект карбахоліну і

опосередковується підвищенням рівня внутрішньоклітинного кальцію, активацією базолатеральних калієвих каналів та потенціюється цАМФ та цГМФ-залежними секетагогами [199]. В дослідженнях на ізольованій ділянці дистального відділу товстої кишки щурів, гістамін дозо-залежно підвищував секреторний потенціал епітелію через вплив на хлорні і калієві канали апікальної мембрани та калієві канали на базолатеральній мембрані. Цей ефект не залежав від вивільнення нейротрансмітерів чи простагландинів [126]. Активація H1-гістамінових рецепторів посилювала секрецію йонів хлору через епітелій товстої кишки мурчаків, цей ефект залежав від рівня простагландинів та інтактного стану ентеральних нейронів [95-96]. Непрямий шлях впливу гістаміну на транспортну функцію епітелію товстої кишки може бути опосередкованим через метаболічне перетворення ейкозаноїдів [96, 160, 200].

Таким чином, гістамін здійснює просекреторний вплив на епітелій товстої кишки *in vitro*, але й досі залишається невідомим шлях дії гістаміну на транспорт води та електролітів у товстій кишці щурів *in vivo*, адже всі перераховані дослідження були зроблені на ізольованих препаратах, так же, як і дослідження впливу антибіотиків на транспорт води та електролітів. В умовах *in vivo*, гістамін викликав зменшення всмоктування води, натрію, та секреції калію, але не викликав змін у транспорті хлору, як і у дослідах з 5-добовим введенням цефтріаксону.

Як відомо, прийом антибіотиків може супроводжуватись запаленням у слизовій оболонці, що було показано у дослідах на мишах [194] При цьому, гістамін бере безпосередню участь у здійсненні реакцій, що супроводжують запалення у товстій кишці. Як було показано у дослідах на щурах [201], де вивчались наслідки гострого коліту, H1 та H4 гістамінові рецептори беруть безпосередню участь у забезпеченні вісцеральної гіперчутливості після розвитку запалення, при цьому, була показана експресія H1 гістамінових рецепторів у дорзальних гангліях, блокада яких пригнічувала вісцеральну гіперчутливість. А більш ранніми дослідженнями було показано, що

цефаклор (антибіотик II покоління цефалоспоринів) може опосередковано, через ССКА рецептори посилювати евакуаторну функцію шлунку через капсаїцин-чутливі аферентні зв'язки [202]. Тобто, можна зробити припущення, що цефтріаксон може впливати на моторну функцію товстої кишки, посилюючи її та, відповідно, зменшуючи час перебування хімусу в просвіті кишки та зменшуючи реабсорбцію води та електролітів.

Таким чином, ААД, викликана цефтріаксоном, може бути опосередкована, принаймні частково, вивільненням з тучних клітин гістаміну, ефект якого спрямований так же, як і дія цефтріаксону: зниженням рівня всмоктування води, натрію та секреції калію. А блокада H1-гістамінових рецепторів лоратадином попереджала просекреторну дію цефтріаксону на транспорт води та натрію. Отже, при призначенні антибіотиків у клінічній практиці може бути доречним призначення лоратадину не лише для запобігання алергічним реакціям, які часто супроводжують прийом антибіотиків, але і для попередження розвитку діареї.

В наших дослідженнях, після 14-добового введення цефтріаксону відбувалось підвищення всмоктування Na^+ , проте спостерігалась реверсія абсорбції на секрецію Cl^- , що на молекулярному рівні супроводжувалось підвищенням експресії мРНК ENaC та Na^+/H^+ обмінника. При цьому, спостерігалось збільшення експресії мРНК CFTR , відносно показників після 5 діб. Введення цефтріаксону впродовж 5 діб не викликало змін у рівні протеїну AQP8 , проте, після його 14-добового введення рівень AQP8 був зменшений в 3 рази. Зниження AQP8 було описано в патогенезі синдрому подразнення товстої кишки з переважанням діареї [189] і асоційованої з запаленням діареї [190].

Дивно, що поряд з секрецією Cl^- всмоктування Na^+ , а також експресія електронейтрального Na^+/H^+ обмінника (NHE3) і електрогенного ENaC збільшується. Збільшення всмоктування Na^+ супроводжується секрецією Cl^- , що може бути пояснене захисною реакцією на зрушення гомеостазу в просвіті товстої кишки. З одного боку, це подолання втрати рідини

(збільшення всмоктування Na^+). З іншого боку, захист цілісності епітеліального шару проти колонізації патогенної мікрофлори і її безпосереднього контакту з епітеліальними клітинами за допомогою відновлення секреції слизу і спалаху бактерій (збільшення секреції СГ). Збільшена експресія CFTR і NHE3 транспортерів також спостерігалися у мишей дикого типу, інфікованих *C. rodentium* [187].

Враховуючи той факт, що антибіотикотерапія викликає порушення в складі мікробіоти товстої кишки, а також відомості про прямий ефект біфідобактерій [161] та лактобактерій [162] на транспорт йонів епітеліальними клітинами, логічно припустити позитивний ефект пробіотиків в попередженні антибіотик-викликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки. Беручи до уваги комплексну складну взаємодію мікроорганізмів нормобіоти людини, перспективним є застосування мультикомпонентних пробіотиків.

Тому метою нашої подальшої роботи було дослідити ефект мультипробіотику «Симбітер®» ацидофільний концентрований (мультипробіотик) на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів у нормі та на тлі антибіотикотерапії цефтріаксоном.

5-добове введення мультипробіотику призводило до зменшення всмоктування води, йонів натрію, зменшення секреції калію порівняно з контрольною групою. Сумарний транспорт йонів хлору залишався без змін. Тобто, мультипробіотик, сам по собі, спричиняє просекреторну дію на транспорт води та електролітів, аналогічно до дії антибіотику.

При цьому, у тварин, яким впродовж 5 днів разом вводили антибіотик з мультипробіотиком, спостерігалось вірогідне збільшення рівня всмоктування води та натрію до вихідного рівня (контрольна група). В сумарному потоці калію достовірних змін ми не спостерігали порівняно з групою, якій вводили сам цефтріаксон. Сумарний транспорт йонів хлору залишився на вихідному рівні (контроль).

При важких інфекційних захворюваннях таких як менінгіт сепсис,

ендокардит [120], тривалість антибіотикотерапії може бути подовжена до 10-14 днів [203]. Тому важливо дослідити ефекти мультипробіотику на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки за умов тривалого введення цефтріаксону

Введення мультипробіотику впродовж 14 діб не викликало змін сумарного транспорту води через епітелій товстої кишки, але зменшувало рівень всмоктування натрію, секреції калію та збільшувало рівень всмоктування хлору.

Сумісне застосування антибіотику з мультипробіотиком впродовж 14 діб попереджало порушення транспортної функції епітелію, викликане застосуванням цефтріаксону. Рівень всмоктування йоннів натрію та секреції калію навіть були вищими за контрольні. А рівень всмоктування хлору порівняно з контрольною групою знизився, в 50 разів.

Узагальнюючи отримані нами дані, можна зробити висновок, що 5-добове введення як антибіотику цефтріаксону, так і мультипробіотику призводить до просекреторних змін сумарних показників транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів. При подовженні терміну введення мультипробіотику до 14 діб просекреторний ефект зникав, тоді як ефект на антибіотик був аналогічним до результатів після 5-добового введення. При цьому, комбіноване введення мультипробіотику разом з цефтріаксоном зменшувало просекреторну дію останнього, як після 5- так і 14-добового введення.

Аналізуючи отримані нами дані, можна припустити, що початкові зрушення у балансі нормофлори кишечника, будь-то в результаті застосування антибіотиків чи пробіотиків, сприймаються організмом як зсув у гомеостазі. Тому діарея виникає як захисна реакція і можливо має запальну природу, зумовлену швидким вивільненням просекреторних медіаторів тучними клітинами. Інша ситуація після 14-добової терапії, коли пробіотичні бактерії колонізують кишечник і організм приходить у збалансоване

співіснування з мікробіотою, тоді як антибіотик продовжує зрушувати цей баланс і навіть призводить до надмірного росту умовно-патогенних бактерій.

На користь нашого припущення є дані, що бактерії коменсали *Lactobacillus plantarum* 299v та *Lactobacillus rhamnosus* GG стимулюють продукцію MUC2 та MUC3 колоноцитами [204]. Це, в свою чергу, відіграє захисну роль та перешкоджає адгезії патогенних мікроорганізмів до епітеліальних клітин слизової оболонки товстої кишки шляхом посилення секреції слизу. Як відомо, цей процес супроводжується паралельним посиленням всмоктування йонів хлору всередину клітини за рахунок електронейтрального обміну з бікарбонат-йонами [5]. Подібний ефект ми спостерігаємо на фоні введення мультипробіотика впродовж 14 діб, але не спостерігаємо подібного ефекту після 5 добового його застосування. Крім цього, встановлено, що *Lactobacillus rhamnosus*10893 та *Bifidobacterium breve* C50 здатні пригнічувати форсколін- чи карбахолін-стимульовану секрецію хлору в дослідах на культурі епітеліоцитів кишечника IEC [161].

Щодо можливого прозапального механізму діареї за короткочасної дії, у наших попередніх експериментах ми спостерігали дегрануляцію тучних клітин слизової оболонки товстої кишки після 5-добового введення цефтріаксону, тоді як після 14-добової терапії ефект був протилежним [186].

Діарея може бути результатом, як зрушень у транспортній функції епітелію, так і посилення моторної функції кишечника. Отримані нами просекреторні зміни на фоні 5-добового введення мультипробіотику аналогічні результатам інших дослідників. Так, мультипробіотик Симбітер був ефективним у попередженні закріпів у літніх щурів завдяки посиленню секреторних процесів через епітелій товстої кишки [205]. Також, даний мультипробіотик, аналогічно до мультипробіотику Апібакт, посилював моторну активність товстої кишки, за умов тривалої гіпоацидності [206].

Для підтвердження ролі мікробіото-асоційованого розвитку прозапальних змін в епітелії товстої кишки як фактору зрушень у транспортній функції епітелію за умов ААД, ми провели дослідження з

пробіотиком небактеріальної природи. У *Saccharomyces boulardii* виявлена здатність продукувати 54 кДа протеазу, яка безпосередньо інактивує токсини *C.difficile* і блокує епітеліальні рецептори для фіксації *C.difficile* [164]. Також *Saccharomyces boulardii* стимулюють вироблення імунної відповіді до токсинів А і В *C.difficile* [164]. Виявлено, що *Saccharomyces boulardii* здатні захищати клітини кишечника та печінки від токсичного впливу антибіотиків (наприклад, кліндаміцину), що проявлялося у зниженні рівня перекисного окислення ліпідів, зменшенні інфільтрації нейтрофілів. Крім цього, введення *Saccharomyces boulardii* на фоні прийому кліндаміцину попереджало підвищення часу транзиту по кишечнику, викликаного цим антибіотиком [165].

Враховуючи, що транспорт води здійснюється переважно пасивно за осмотичним градієнтом, створеному транспортом йонів, збільшення секреції йонів хлору колоноцитами супроводжується виходом води в порожнину кишечника і сприяє розвитку діареї. У товстій кишці секреція хлору здійснюється через цАМФ-залежні (CFTR) і кальцій-активованні (CaCC) хлорселективні канали. D. Czerucka з співавт. (1999) виявили, що *S.boulardii* здатні пригнічувати секрецію хлору, викликану холерним токсином, як через CFTR канали, так і через CaCC канали [166]. Ми також встановили, що додавання *S.boulardii* (Ентерол®250) запобігало змінам у транспорті хлору, викликаних цефтріаксоном, і попереджало розвиток діареї. Крім безпосереднього впливу на хлорселективні канали, *S.boulardii* здатні попереджати розвиток ААД за рахунок пригнічення росту патогенних мікроорганізмів і підтримки нормобіоти кишечника. Коротколанцюгові жирні кислоти, які утворюються при розщепленні вуглеводів нормофлори кишечника, посилюють всмоктування хлору через активацію Cl⁻/K⁺ і HCO₃⁻/K⁺ обмінників, що також попереджає розвиток діареї.

Сумісне введення *S. boulardii* з цефтріаксоном впродовж 5 днів, попереджувало просекреторні ефекти антибіотику (рис. 12А). Таким чином,

застосування *S.boulardii* та мультипробіотику на тлі введення цефтріаксону є обґрунтованим методом профілактики розвитку ААД.

Таким чином, додавання пробіотику *S.boulardii* (Ентерол®250) при діарей збільшувало всмоктування води, що клінічно проявлялося в зменшенні частоти та тривалості діарей. При прийомі *S.boulardii* (Ентерол®250) показали найбільшу ефективність в зменшенні тривалості розвитку ААД.

ВИСНОВКИ

Вперше встановлено, що порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, як механізму антибіотикасоційованої діареї, характерно лише для певних груп антибіотиків, зокрема антибіотику цефалоспоринового ряду III покоління цефтріаксону.

1. Парентеральне введення антибіотику ряду цефалоспоринів цефтріаксону в дозі 50 мг/кг впродовж 5 днів викликало зменшення всмоктування води, яке напочатку було зумовлено зменшенням всмоктування натрію та секрецією калію. Зі збільшенням дози до 300 мг/кг та тривалості введення антибіотиків до 14 днів ці зміни асоціювалися зі збільшенням секреції хлору. Пероральне введення антибіотиків ряду цефалоспоринів цефіксиму (10 мг/кг) та ряду макролідів азитроміцину (15 мг/кг), навпаки, збільшувало всмоктування води, переважно за рахунок підвищеного всмоктування йонів хлору через епітелій товстої кишки щурів.

2. Введення цефтріаксону впродовж 5 днів не викликало достовірних змін у рівні протеїну AQP8, та мРНК NHE3, але зменшувало в 1,4-рази мРНК ENaC, та підвищувало в 1,4-рази – мРНК CFTR. Після введення цефтріаксону впродовж 14-ти днів зменшувався в 3-рази рівень протеїну AQP8 та підвищувалося в 2,4-рази мРНК NHE3, в 1,6-разів мРНК ENaC та в 1,9-разів – мРНК CFTR. Отже, порушення транспортної функції епітелію товстої кишки щурів за дії цефтріаксону, принаймі частково, зумовлені змінами в експресії транспортерів іонів Na^+ , Cl^- та аквапоринових каналів AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів.

3. Зміни у рівні секреції слизу в товстій кишці щурів за дії антибіотику цефтріаксону відповідають змінам у рівні секреції хлору. Після 5-добового введення цефтріаксону спостерігалось значне зниження, а після 14-добового введення, навпаки, збільшення секреції слизу.

4. Введення цефтріаксону викликає прозапальні зміни в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що супроводжується дегрануляцією тучних клітин, основним медіатором яких є гістамін. Гістамін справляє аналогічну до цефтріаксону (просекреторну) дію на транспорт води, натрію та калію через епітелій товстої кишки щурів. Блокада H_1 -гістамінових рецепторів лоратадином попереджає клінічні прояви цефтріаксонвикликаного діареї, що супроводжувалось відновленням показників сумарного потоку води та калію через епітелій товстої кишки щурів.

5. На відміну від цефтріаксону, азитроміцин підвищує всмоктувальну здатність епітелію товстої кишки щурів, що супроводжується збільшенням рівня протеїну аквапоринових каналів AQP8 та характеризується відсутністю дегрануляції тучних клітин у стінці товстої кишки.

6. Комплексне застосування мультипробіотику (бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9) та пробіотику на основі *Saccharomyces boulardii* на фоні терапії цефтріаксоном попереджає просекреторні зміни в епітелії товстої кишки. Цей ефект зумовлений підвищенням всмоктування води, яке асоціювалось зі змінами в сумарному транспорті йонів калію та не залежало від сумарного транспорту йонів натрію та хлору.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kunzelmann K. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease / K. Kunzelmann, M. Mallf // *Physiological Reviews*. – 2002. – Vol. 82. – P. 245-289.
2. Ricanek P. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease / P. Ricanek, L.K. Lunde, S.A. Frye [et al] // *Clinical and Experimental Gastroenterology*. – 2015. - Vol. 8. – P. 49–67.
3. Li M. Effects of ceftriaxone-induced intestinal dysbacteriosis on dendritic cells of small intestine in mice / M. Li, W. Li, S. Wen [et al] // *Microbiol Immunol*. – 2013. – Vol. 57, № 8. – P. 561-8.
4. Heuvelin E., Lebreton C., Bichara M., Cerf-Bensussan N., Heyman M. A. Bifidobacterium probiotic strain and its soluble factors alleviate chloride secretion by human intestinal epithelial cells // *J Nutr*. – 2010. – Vol. 140, № 1. – P. 7-11.
5. Raheja G. Lactobacillus acidophilus stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism / G. Raheja, V. Singh, K. Ma [et al] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2010. - Vol. 298, № 3. – P. G395-401.
6. Murphy J.L. Adverse Events in Pediatric Patients Receiving Long-term Oral and Intravenous Antibiotics / J.L. Murphy, N. Fenn, L. Pyle [et al] // *Hosp Pediatr*. – 2016. - Vol. 6, № 6. – P. 330-8.
7. Zakordonets L. Different regimes of multiprobiotic for prevention of immediate and delayed side effects of antibiotic therapy in children / L. Zakordonets, G. Tolstanova, D. Yankovskiy [et al] // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. - Vol. 7, № 3. – P. 2194-2201.

8. Tracey L. From the hospital to the home--the rise and rise of *Clostridium difficile* infection / L. Tracey, A. Kirke, P. Armstrong, T.V. Riley // *Aust Fam Physician*. – 2015. - Vol. 44, № 10. – P. 712-7.
9. Rohde C.L., Bartolini V., Jones N. The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile*-associated diarrhea / C.L. Rohde, V. Bartolini, N. Jones // *Nutr Clin Pract*. – 2009. - Vol. 24. – P. 33-40.
10. Костюкевич О.И. Антибиотикоасоциированная діарея: міфи и реальность / О.И. Костюкевич // *Русский медицинський журнал*. – 2009. – Т. 17, № 7. - С. 459-464.
11. Goldhill J.M., Rose K., Percy W.H. Effects of antibiotics on epithelial ion transport in the rabbit distal colon in-vitro / J.M. Goldhill, K. Rose, W.H. Percy // *J Pharm Pharmacol*. – 1996. - Vol. 48, № 6. – P. 651-6.
12. Giannella R.A. Effect of clindamycin on intestinal water and glucose transport in the rat / R.A. Giannella, J. Serumag, D. Walls, K.W. Drake // *Gastroenterology*. – 1981. - Vol. 80, № 5. – P. 907–13.
13. Lakshmi R. Role of lactamases in antibiotic resistance: a revien / R. Lakshmi, K.S. Nurin, G.A. Vishma, K.S. Sreelashmi // *Int. Res. J. Rharm*. – 2014. - Vol. 5, № 2. – P. 37-40.
14. Coates A.R.M. Novel classes of antibiotics or more of the same? / A.R.M. Coates, G. Halls, and Y. Hu // *J Pharmacol*. – 2011. - Vol. 163, №1. – P. 184–194. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x
15. Hickson M. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection / Mary Hickson // *Therap Adv Gastroenterol*. 2011. - Vol. 4, № 3/ – P. 185–197.
16. Костюкевич О.И. Антибиотикоасоциированная діарея: міфи и реальность / О.И. Костюкевич // *Здоров'я України*. – 2010. Т. 18, № 247. – С. 56-57.
17. John G. Antibiotic-associated diarrhea / G. John, M.D. Bartlett // *N Engl J*

- Med. – 2002. - Vol. 346, № 5. – P. 334-339.
18. McCracken, V. J., Lorenz R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota / V. J. McCracken, R. G. Lorenz // *Cell. Microbiol.* – 2003. - Vol. 3. – P. 1–11.
 19. ЯНКОВСКИЙ Д.С., ДЫМЕНТ Г.С. Микрофлора и здоровье человека. – Київ: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
 20. Berg A.M. Clostridium difficile infection in the inflammatory bowel disease patient / A.M. Berg, C.P. Kelly, F.A. Farraye // *Inflamm Bowel Dis.* – 2013. - Vol. 19, № 1. – P. 194-204.
 21. Mylonakis E. Clostridium difficile associated diarrhea: a review / E. Mylonakis, E. T. Ryan, S. B. Calderwood // *Arch. Intern. Med.* - 2001. - Vol. 161. – P. 525–533.
 22. Beaugerie L. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhea / L. Beaugerie, J.C. Petit // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* – 2004. - Vol. 18. – P. 337-52.
 23. Reisinger C. Diarrhea Caused by Primarily Non-Gastrointestinal Infections / C. Reisinger, C. Fritzsche, R. Krause, G.J. Krejs // *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology.* – 2005. - Vol. 2, № 5. - P. 216-222.
 24. Bartlett J.G. Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease / J.G. Bartlett // *Ann Intern Med.* – 2006. - Vol. 145. – P. 758-64.
 25. Karlström O. A prospective nationwide study of Clostridium difficile-associated diarrhea in Sweden. The Swedish C. difficile Study Group / O. Karlström, B. Fryklund, K. Tullus, L.G. Burman A // *Clin Infect Dis.* – 1998. - Vol. 26, - № 1. - P. 141-5.
 26. Wiström J. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study / J. Wiström, S.R. Norrby, E.B. Myhre [et al] // *J Antimicrob Chemother.* – 2001. - Vol. 47, № 1. – P. 43-50.

27. Spencer R.C. Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile*-associated disease / R.C. Spencer // *J Antimicrob Chemother.* – 1998. - Vol. 41. - P. 5-12.
28. Carter G.P. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease / G.P. Carter, J.I. Rood, D. Lyras // *Gut Microbes.* – 2010. - Vol. 1, № 1. – P. 58–64.
29. Ng J. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome / J. Ng, S.A. Hirota, O. Gross [et al.] // *Gastroenterology.* - 2010. - Vol. 139. - P. 542-552.
30. Viscidi R. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile* / R. Viscidi, B.E. Laughon, R. Yolken [et al.] // *J. Infect. Dis.* - 1983. - Vol. 148. - P. 93-100.
31. Sanchez-Hurtado K. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls / K. Sanchez-Hurtado, M. Corretge, E. Mutlu [et al.] // *J. Med. Microbiol.* - 2008. - Vol. 57. - P. 717-724.
32. Leffler D.A. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease / D.A. Leffler, J.T. Lamont // *Gastroenterology.* - 2009. - Vol. 136. - P. 1899-1912.
33. Bartlett J. G. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea / Bartlett J. G. // *N. Engl. J. Med.* - 2002. - Vol. 346. – P. 334–339.
34. Cummings J. H. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood / J. H. Cummings, E. W. Pomare, W. J. Branch, C. [et al.] // *Gut.* - 1987. - Vol. 28. – P. 1221–1227.
35. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. д-ра. биол. наук. – Москва, 2003. –45 с.
36. Lefebvre P. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation / P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, B. Staels [et al.] // *Physiological Reviews.* - 2009. - Vol. 89, №. 1. - P. 147–191.

37. Ratnaïke R.N. Mechanisms of drug-induced diarrhoea in the elderly / R.N. Ratnaïke, T.E. Jones // *Drugs Aging*. – 1998. - Vol. 13, №3. – P. 245-53.
38. Zwolinska-Wcislo M. Antibiotic treatment with ampicillin accelerates the healing of colonic damage impaired by aspirin and coxib in the experimental colitis. Importance of intestinal bacteria, colonic microcirculation and proinflammatory cytokines / M. Zwolinska-Wcislo, G. Krzysiek-Maczka, A. Ptak-Belowska [et al.] // *Journal of physiology and pharmacology*. – 2011. – Vol. 62. – № 3. – P.357-368.
39. Хендерсон Дж. Патофизиология органов пищеварения. Пер. с англ. канд. мед. наук Т. Д. Власова. – Санкт-Петербург: Невский диалект. – 1997. –283 с.
40. Binder H.J. Electrolyte absorption and secretion in the mammalian colon / H.J. Binder, G.I. Sandle // In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (2nd ed.), edited by Johnson LR. New York: Raven. – 1987. - P. 1389–1411.
41. Preston G.M. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family / G.M. Preston, P. Agre // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1991. – Vol. - 88. – P. 11110–14.
42. Preston G.M. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein / G.M. Preston, T.P. Carroll, W.B. Guggino [et al.] // *Science*. – 1992. – Vol. 256. – P. 385–7.
43. Nielsen S. Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine / S. Nielsen, J. Frokiaer, D. Marples [et al.] // *Physiol Rev*. – 2002. - Vol. 82. P. 205–44;
44. Ma T.H. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology / T.H. Ma, A.S. Verkman // *J Physiol*. – 1999. - Vol. – 517. – P. 317–26.
45. Nielsen S. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat / S. Nielsen, L.S. King, B.M. Christensen [et al.] // *Amer J Physiol*. – 1997. - Vol. – 273. – P. 1549–61.

46. Nielsen S. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain / S. Nielsen, E. A. Nagelhus, M. Amiry-Moghaddam [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. - 1997, Vol. – 17, №1. – P. 171-180.
47. Hasegawa T. Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin-dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3 / T. Hasegawa, H. Tanii, M. Suzuki, S. Tanaka // *Endocrinology*. - 2003, Vol. – 144, №9. – P. 4087–4096.
48. Nicchia G. P. Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver / G. P. Nicchia, A. Frigeri, B. Nico [et al.] // *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2001. Vol. 49, № 12. – P. 1547–1556.
49. Титовец Э.П. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты. Минск: Белорус. наука, 2007. 239 с.
50. Hirano Y. Molecular mechanisms of how mercury inhibits water permeation through aquaporin-1: understanding by molecular dynamics simulation / Y. Hirano, N. Okimoto, I. Kadohira [et al.] // *Biophys J*. 2010. - Vol. 98, № 8. - P. 1512–1519.
51. Matsuzaki T. Immunolocalization of the water channel, aquaporin-5 (AQP5), in the rat digestive system / T. Matsuzaki, Y. Tajika, T. Suzuki [et al.] // *Arch Histol Cytol*. - 2003. - Vol. 66, № 4. - P. 307–15.
52. Verkman A.S. Aquaporins in clinical medicine / A.S. Verkman // *Annu Rev Med*. - 2012. - Vol 18, № 63. - P 303–316.
53. Wakayama Y. Aquaporin expression in normal and pathological skeletal muscles: a brief review with focus on AQP4 / Y. Wakayama // *Biomed Biotechnol*. - 2010. - № 731569.
54. Verkman A. Structure and function of aquaporin water channels / A. Verkman, A. Mitra // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. - 2000. - Vol. 278, № 1. - P. 13–28.

55. Zeidel M. Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes / M. Zeidel, S. Nielsen, B. Smith [et al.] // *Biochemistry*. - 1994. - Vol. 33, № 6. - P. 1606–1615.
56. Koyama Y. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract / Y. Koyama, T. Yamamoto, T. Tani [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol*. - 1999. - Vol. 276. - P. 621-627.
57. Rajendran V.M. Characterisation and molecular localization of anion transporters in colonic epithelial cells / V.M. Rajendran, H.J. Binder // *Ann. NY Acad. Sci.* - 2000. – Vol. 915. – P. 15-29.
58. Rajendran V.M. Ouabain-sensitive H-,K-ATPase functions as Na-,K-ATPase in apical membranes of rat distal colon / V.M. Rajendran, J. Geibel, H.J. Binder // *J Biol Chem*. - 2000. - Vol. 27. - P.130-139.
59. Ma T. Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart / T. Ma, B. Yang, A.S. Verkman // *Biochem Biophys Res Commun*. - 1997. - Vol. 240. - P.324-328.
60. Ricanek P. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease / P. Ricanek, L. Lunde, S. Frye [et al.] // *Clinical and Experimental Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 8. – P. 49-67.
61. Clauss W. Segmental differences in electrical properties and Na⁺-transport of rabbit cecum, proximal and distal colon in vitro / W. Clauss, H. Schafer, I. Horch, H. Hornicke // *Pflugers Arch*. - 1985. - Vol. 403. - P. 278-282.
62. Yau W.M. Comparison of transport mechanisms in isolated and descending rat colon / W.M. Yau, G.M. Makhlouf // *Am J Physiol*. - 1975. - Vol. 228. - P. 191-195.
63. Binder H.J. Electrolyte transport in the mammalian colon / H.J. Binder, G.I. Sandle // *In Physiology of the Gastrointestinal tract*, edited by Johnson L R. New York: Raven. - 1994. - Vol.33. - P. 213-217.

64. Barbry P. Molecular biology of Na⁺ absorption / P. Barbry, P. Hofman // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 1997. - Vol. 127. - P. 571-585.
65. Zeissig S. Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease / S. Zeissig, T. Bergann, A. Fromm [et al.] // *Gastroenterology.* – 2008. - Vol. 134, № 5. – P.1436-47.
66. Greger R. Role of CFTR in the colon // *Annual Review of Physiology.* – 2000. - Vol. 62. – P. 467-491.
67. Abrahamse S.I. Two distinct K⁺-ATPase activities in rabbit distal colon / S.I. Abrahamse, H.R. Jonge, R.J. Bindels, C.H. van Os // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1995. - Vol. 207. - P. 103-108.
68. Sullivan S. Downregulation of Sodium Transporters and NHERF Proteins in IBD Patients and Mouse Colitis Models: Potential Contributors to IBD-associated Diarrhea / S. Sullivan, P. Alex, T. Dassopoulos [et al.] // *Inflamm Bowel Dis.* – 2009. - Vol. 15, № 2. - P. 261-274.
69. Quinton P.M. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport / P.M. Quinton // *FASEB J.* - 1990. - Vol. 4. - P. 270-277.
70. Schweinfest C.W. Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas / C.W. Schweinfest, K.W. Henderson, S. Suster [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – V.90 – P. 4166–4170.
71. Perrone R.D. Aldosterone and P_{CO2} enhance rubidium absorption in rat distal colon / R.D. Perrone, D.E. McBride // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 1988. - Vol. 254. - P. 898-906.
72. Suzuki Y. Basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in epithelial cells from guinea pig distal colon / Y. Suzuki, K. Kaneko, M. Maruyama, H. Hayashi // *Jpn. J. Physiol.* – 1994. – V. 44, Suppl. 2. – P. S305–S307
73. Хендерсон Д.М. Патофизиология органов пищеварения.- М.: Vinom Publishers, 1999. – 283с.

74. Kaunitz J.D. Identification of a vanadate-sensitive potassium-dependent proton pump from rabbit colon / J.D. Kaunitz, G. Sachs // *J Biol Chem.* - 1986. - Vol. 261. - P. 140-159.
75. Perrone R.D. Aldosterone and P_{CO_2} enhance rubidium absorption in rat distal colon / R.D. Perrone, D.E. McBride // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 1996. - Vol. 254. - P.898-906.
76. Dorge A. Cellular site of active K^+ absorption in the guinea-pig distal colon epithelium / A. Dorge, F.X. Beck, G. Rechkemmer // *Pflugers Arch.* - 1998. – Vol. 436. - P. 280-288.
77. Rajendran V.M. Distribution and regulation of apical Cl^- /anion exchanges in surface and crypt cells of rat distal colon / V.M. Rajendran, H.J. Binder // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1999. – Vol.276. – P. G132–G137.
78. Lee M.G. Regulation of Cl^-/HCO_3^- exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells / M.G. Lee, W.C. Wigley, W. Zeng [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 3414–3421.
79. Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea / Michael Field // *J Clin Invest.* – 2003. - Vol. 111, № 7. - 931–943.
80. Bartolo R.C. Secretagogues stimulate electrogenic HCO_3^- secretion in the ileum of the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*: evidence for the role of a Na^+/HCO_3^- cotransporter / R.C. Bartolo, N. Harfoot, M. Gill [et al.] // *J Exp Biol.* – 2009. - Vol. 212, № 16. – P. 2645-55.
81. Tang L. Calcium-sensing receptor stimulates Cl^- - and SCFA-dependent but inhibits cAMP-dependent HCO_3^- secretion in colon. / L. Tang, M. Peng, L. Liu // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2015. - Vol. 308, № 10. – P. G874-83.

82. Dvorak A.M. Chron's disease: transmission electron microscopics studies / A.M. Dvorak, R.A. Monahan, I.E. Osage, G.R. Dickersin // *Hum Pathol.* – 1980. - Vol. 11. - P. 606-619.
83. Galli S.J. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function / S.J. Galli, A.M. Dvorak, H.F.Dvorak // *Prog Allergy* – 1984. - Vol. 34. – P. 1-141.
84. Hansbro P.M. Importance of mast cell Prss31/transmembrane tryptase/tryptase- γ in lung function and experimental chronic obstructive pulmonary disease and colitis / P.M. Hansbro, M.J. Hamilton, M. Fricker [et al.] // *J Biol Chem.* – 2014. - Vol. 289, № 26. P. 18214–27.
85. De Winter B.Y. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances / B.Y. De Winter, R.M. van den Wijngaard, W.J.de Jonge // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* – 2012. - Vol. 1822, № 1. - 66–73.
86. Fox C.C. Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis / C.C. Fox, A.J. Lazenby, W.C. Moore [et al.] // *Gastroenterology.* – 1990. - Vol. 99, № 1. – P. 119–24.
87. Urb M.The Role of Mast Cells in the Defence against Pathogens / M. Urb, D. C. Sheppard, J. Heitman // *PLoS Pathog.* – 2012. - Vol. 8, № 4. – P. e1002619.
88. Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л. Очерки биохимической фармакологии. М.: РЦ Фармединфо, 1996. - 384 с.
89. Вайсфельд И.Л., Кассиль Г.Н. Гистамин в биохимии и физиологии. - М.: Наука, 1981. - 24 с.
90. Kennedy L. Histamine and histamine receptor regulation of gastrointestinal cancers / L. Kennedy, K. Hodges, F. Meng [et al.] // *Transl Gastrointest Cancer.* – 2012. - Vol. 1, № 3. – P. 215–227.

91. McCabe R.D. Effects of histamine receptor antagonists on ion transport in rabbit descending colon / R.D. McCabe, P.L. Smith // *Am J Physiol.* - 1984. - Vol. 247. - P. 168-203.
92. Ahrens F. Histamine-induced chloride secretion is mediated via H₂-receptors in the pig proximal colon / F. Ahrens, G. Gabel, B. Garz // *Inflamm Res.*- 2003. - Vol. 2. - P. 79-85.
93. Traynor T.R. Effects of inflammatory mediators on electrolyte transport across the porcine distal colon epithelium / T.R. Traynor, D.R. Brown // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1993. - Vol. 1. - P. 6-61.
94. Rangachari P.K. Functional subtyping of histamine receptors on the canine proximal colonic mucosa / P.K. Rangachari // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1994. - Vol. 2. - P. 26-48.
95. Cooke H.J. Coordination of Cl⁻ secretion and contraction by a histamine H₂-receptor agonist in guinea pig distal colon / H.J. Cooke, Y.Z. Wang // *Am J Physiol.* - 1995. - Vol. 5. - P. 8-21.
96. Wang Y.Z. Histamine augments colonic secretion in guinea pig distal colon / Y.Z. Wang, H.J. Cooke, H.C. Su, R. Fertel // *Am J Physiol.* – 1990. - Vol. 258, № 3. – P. G432–9.
97. Gelbmann C.M. Mast cells and histamine contribute to bile acid-stimulated secretion in mouse colon / C.M. Gelbmann, C.D. Schteingart, S.M. Thompson // *J Clin Invest.*- 1995. - Vol. 6. - P. 9-14.
98. Keely S.J. Regulation of ion transport by histamine in human colon / S.J. Keely, W.A. Stack, D.P. O'Donoghue, A.W. Baird // *Eur J Pharmacol.* – 1995. - Vol. 279, № 2-3. – P. 203–9.
99. Markel H. The Real Story Behind Penicillin / H. Markel // *PBS NEWSHOUR.* – 2013. P. 284
100. Antibiotic prescribing guide [Text] / PDR Montvale: Thomson PDR, 2005. – 331p.

101. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Синдром диареи. М.: ГЭОТАР–медицина, 2000. – 135с.
102. Ходош Е.М. Очерки по клинической антибиотикотерапии: история, происхождение, природа и действие. – Х. Майдан, 2003. – 303с.
103. Ребенок Ж.О. Принципи раціональної антибіотикотерапії. Методичні рекомендації. – К., 2003. – 43с.
104. Stoeckel K. Effects of concentration-dependent plasma protein binding on ceftriaxone kinetics / K. Stoeckel, P.J. McNamara, R. Brandt, H. Plozza-Nottebrock, W.H.Ziegler // Clin Pharmacol Ther. – 1981. - Vol. 29, № 5. – P. 650-7.
105. Волосовець О.П., Кривопустов С.П. Цефалоспорины в практиці сучасної педіатрії: Монографія. – Х. Прапор, 2007. – 183с.
106. Коритнюк Р.С. Властивості та раціональне застосування антибіотиків і сульфаніламідних препаратів. Методичні рекомендації / Р.С. Коритнюк, Г.М. Вайтенко, О.В. Дульцева– К., 2007. – 40с.
107. Марушко Ю.В
раннего возраста препаратом лицидофил / Ю.В. Марушко, Г.Г. Шеф // Перинатология и педиатрия – 2007. – №4. – С. 65-68.
108. Посохова К.А. Побічна дія антибіотиків аміноглікозидов: сучасний погляд на проблему / К.А. Посохова, О.П. Вікторов // Фармацевтичний журнал. – 2005. – № 2. – С. 57-58.
109. Roberts M. Stimulation of sodium transport by duramycin in cultured human colonic epithelia / M. Roberts, S.B. Hladky, R.J. Pickles, A.W. Cuthbert // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1991. - Vol. 259, № 3. – P. 1050–8.
110. Перший національний конгрес з біоетики [Електронний ресурс] // Еженедельник АПТЕКА – 2001. – Т. 308, № 37 (від 24.09.2001). - Режим доступу до журн. :<http://www.apteka.ua/archives/308/index.html>

111. Мальцев В.И. Этическая оценка методик проведения исследований [Электронный ресурс] / В.И. Мальцев, Д.Ю. Белоусов // Еженедельник Аптека. – 2001. – Т. 305, № 34 (від 03.09.2001). - Режим доступу до журн. : <http://www.apteka.ua/archives/305/16155.html>
112. Сторожаков Г.И. Оценка методик проведения исследований / Г.И. Сторожаков, Е.А. Малышева // Качественная клиническая практика. – 2001. – № 1. – С. 21–30.
113. Schedl H.P. Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption studies in man / H.P. Schedl, D. White // Gut. – 1966. - Vol. 7, № 2. – P. 159-163.
114. Sladen G.E. Studies on the effects of unconjugated dihydroxy bile salts on rat small intestinal function in vivo / G.E. Sladen, J.T. Harries // Biochem Biophys Acta. – 1972. - Vol. 288, № 2. - P. 443-456.
115. Konturek P. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase COX-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats / P. Konturek, T. Brzozowski, P. Pierzchalski, S. Kwiecien [et al.] // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1998/ - Vol. 12, № 8. – P. 767-777.
116. Akiba Y. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum / Y. Akiba, P.H. Guth, E. Engel [et al.] // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. - 2000. - Vol. 279. - № 2. – P. G437–447.
117. Vyhnánek F. Use of 3rd generation cephalosporins in antimicrobial prophylaxis in surgery / F. Vyhnánek, O. Lochmann // Rozhl Chir. – 1994. – Vol. 73, № 3. - P. 129-32.
118. Cojocel C. Protection against cephalosporin-induced lipid peroxidation and nephrotoxicity by (+)-cyanidanol-3 and vitamin E / C. Cojocel, K.L. Tolle, H. El-Hajj [et al] // Braz J Med Biol Res. – 2007. – Vol. 40, № 6. - P. 867-75.

119. Li M. Effects of ceftriaxone-induced intestinal dysbacteriosis on dendritic cells of small intestine in mice / M. Li, W. Li, S. Wen [et al] // *Microbiol Immunol.* – 2013. – Vol. 57, № 8. – P. 561-8.
120. Amelieke J. H. Cremers Effect of antibiotic streamlining on patient outcome in pneumococcal bacteraemia / J. H. Amelieke Cremers, T. Sprong, A. S. Jeroen [et al] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2014. - Vol. 69. – P. 2258-2264.
121. Bertrand P.P. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa / P.P. Bertrand, W.A. Kunze, J.C. Bornstein [et al] // *Am J Physiol.* – 1997. Vol. 273, № 2. - P. 422-35.
122. Vidyasagar S. Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃ secretion / S. Vidyasagar, C. Barmeyer, J. Geibel [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2005. - Vol. 288, № 6. - P. 1217-26.
123. Boirivant M. Intestinal microflora and immunoregulation / M. Boirivant, A. Amendola, A. Butera // *Mucosal Immunol.* – 2008. Vol. 1, № 1. - P. S47-9.
124. Eckburg P.B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P.B. Eckburg, E.M. Bik, C.N. Bernstein [et al.] // *Science.* – 2005. - Vol. 308, № 5728. – P. 1635-8.
125. Boirivant M. Inflammatory bowel disease / M. Boirivant, A. Cossu // *Journal Oral Dis.* – 2012. - Vol. 18, № 1. - P. 1-15.
126. Schultheiss G. Histamine-induced ion secretion across rat distal colon: involvement of histamine H₁ and H₂ receptors / G. Schultheiss, B. Hennig, W. Schunack [et al] // *Eur J Pharmacol.* – 2006. – Vol. 546, № 1-3. - P. 161-70
127. Oliynyk I. Azithromycin increases chloride efflux from cystic fibrosis airway epithelial cells / I. Oliynyk, G. Varelogianni, M. Schalling [et al.] // *Experimental lung research.* – 2009. – Vol. 35, № 3. - P. 210-221.
128. Rafal'skiĭ V.V. Cefixim: clinical pharmacology and role in therapy of urogenital infections / V.V. Rafal'skiĭ, E.V. Divgan, A.V. Derevitskiĭ //

- Urologiia. – 2011. - № 2. – P. 63-66.
129. Веселов А.В., Козлов Р.С. Азитромицин: современные аспекты клинического применения / А.В. Веселов, Р.С. Козлов // Клинический микробиологический антимикроб. химиотер. – 2006. – Т. 8, № 6. – С. 18-32.
 130. Цирюк О.І. Вплив макролідів на секреторну функцію шлунка: дис. ... кандидата біол. наук: / Цирюк Олена Іванівна. – К., 2004. –98 с.
 131. Мостовий Ю. М. Сучасні класифікації та стандарти лікування розповсюджених захворювань внутрішніх органів : довід.-посіб. / ред.: Ю. М. Мостовий; Вінниц. нац. мед. ун-т ім. М.І.Пирогова. - 9-е вид., доповн. і переробл. - Вінниця: ДП "ДКФ", 2007. - 479 с. - укр.
 132. Kunzelmann K. ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl(-) concentration mediated through activation of Cl(-) channels / K. Kunzelmann // Pflugers Arch. – 2003. – Vol. 445, № 4. – P. 504-512.
 133. Ricanek P. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease / P. Ricanek, L. Lunde, S. Frye [et al.] // Clinical and Experimental Gastroenterology. – 2015. – Vol. 8. – P. 49-67.
 134. Dovbynychuk T. The colonic ion transport and mucus secretion during treatment with broad spectrum antibiotic ceftriaxone / T. Dovbynychuk, A. Dranitsina, T. Chervinska [et al.] // Dig Dis Sci. Budapest, Hungary. – 2014. - Vol. 59, №8. – P. 1652- 1653.
 135. Johansson M.E. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine / M.E. Johansson, D. Ambort, T. Pelaseyed [et al.] // Cell Mol Life Sci. – 2011. - Vol. 68, № 22. – P. 3635-41.
 136. Gao J.H. Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract / J.H. Gao, L.J. Guo, Z.Y. Huang [et al.] // J Physiol Pharmacol. – 2013. - Vol. 64, - № 6. - 681-93.

137. Turner J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease / Jerrold R. Turner // *Nature Reviews Immunology*. - 2009. – Vol. 9, № 11. – P. 799-809. doi:10.1038/nri2653
138. Satchithanandam S. Effects of dietary fibers on gastrointestinal mucin in rats / S. Satchithanandam, D.M. Klurfeld, R.J. Calvert, M.M. Cassidy // *Nutr Res*. - 1996. – Vol. 16. – P. 1163-1177.
139. Voynow J.A. Mucins, mucus, and sputum / J.A. Voynow, B.K. Rubin // *Chest*. – 2009. - Vol. 135, № 2. – P. 505-12. doi: 10.1378/chest.08-0412.
140. Donald W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy / Donald W. Kufe // *Nat Rev Cancer*. – 2009. - Vol. 9, № 12. – P. 874–885.
141. Davies J.R. Gel-forming and cell-associated mucins: preparation for structural and functional studies / J.R. Davies, C. Wickström, D.J. Thornton // *Methods Mol Biol*. – 2012. - Vol. 842. – P. 27-47.
142. Derrien M. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract / M. Derrien, M.W.J. van Passel, H.B. Jeroen van de Bovenkamp // *Gut Microbes*. – 2010. - Vol. 1, № 4. – P. 254–268.
143. Macfarlane S. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system / S. Macfarlane, E. J. Woodmansey, T. G. Macfarlane // *Appl Environ Microbiol*. – 2005. - Vol. 71, № 11. – P. 7483–7492.
144. Birchenough G.M.H. New developments in goblet cell mucus secretion and function / G.M.H. Birchenough, M.E.V. Johansson, J.K. Gustafsson [et al.] // *Mucosal Immunology* 8. – 2015. – P. 712-719.
145. Bringiotti R. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? / R. Bringiotti, E. Ierardi, R. Lovero [et al.] // *World J Gastrointest Pathophysiol*. – 2014. - Vol. 5, № 4. P. 550–9.
146. Kronman M.P. Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study / M.P. Kronman, T.E. Zaoutis, K. Haynes [et al.] // *Pediatrics*. – 2012. - Vol. 130, № 4. – P. 794–803.

147. Wlodarska M. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis / M. Wlodarska, B. Willing, K.M. Keeney [et al.] // *Infect Immun.* – 2011. - Vol. 79, - № 4. – P. 1536–45.
148. Hansbro P.M. Importance of mast cell Prss31/transmembrane tryptase/tryptase- γ in lung function and experimental chronic obstructive pulmonary disease and colitis / P.M. Hansbro, M.J. Hamilton, M. Fricker // *J Biol Chem.* – 2014. - Vol. 289, № 26. – P. 18214–27.
149. De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances / B.Y. van de Winter, R.M. van den Wijngaard, W.J. van de Jonge // *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* – 2012. - Vol. 1822, № 1. – P. 66–73.
150. Fox C.C. Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis / C.C. Fox, A.J. Lazenby, W.C. Moore [et al.] // *Gastroenterology.* – 1990. - Vol. 99, № 1. – P. 119–24.
151. Rampton D.S. Rectal mucosal histamine release in ulcerative colitis / D.S. Rampton, R.D. Murdoch, G.E. Sladen [et al.] // *Clin Sci (Lond).* – 1980. - Vol. 59, № 5. – P. 389–91.
152. Knutson L. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease / L. Knutson, O. Ahrenstedt, B. Odling, R. Hällgren // *Gastroenterology.* – 1990. - Vol. 98, № 4. – P. 849–54.
153. Schultheiss G. Histamine-induced ion secretion across rat distal colon: involvement of histamine H1 and H2 receptors / G. Schultheiss, B. Hennig, W. Schunack [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2006. - Vol. 546, № 1-3. – P. 161–70.
154. Keely S.J. Regulation of ion transport by histamine in human colon / S.J. Keely, W.A. Stack, D.P. O'Donoghue, A.W. Baird // *Eur J Pharmacol.* – 1995. - Vol. 279, № 2-3. – P. 203–9.
155. Carson H.J. Mast cell tryptase in a case of anaphylaxis due to repeat

- antibiotic exposure / H.J. Carson, B.A. Cook // *Leg Med (Tokyo)*. – 2009. - Vol. 11, № 5. – P. 234-6.
156. Yamamoto T. Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model / T. Yamamoto, T. Kodama, J. Lee [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 858-88.
157. Evódie I.F. Systemic mastocytosis in childhood: report of 3 cases / I. F. Evódie, C. de Faria Beatriz, A. Cartell [et al.] // *J Pediatr (Rio J)*. – 2002. - Vol. 78, № 2. – P. 176-80.
158. Baum C.A. Increased colonic mucosal mast cells associated with severe watery diarrhea and microscopic colitis / C.A. Baum, P. Bhatia, P.B. Jr. Miner // *Dig Dis Sci*. – 1989. - Vol. 34, № 9. – P. 1462-5.
159. Xu J.D. Emodin induces chloride secretion in rat distal colon through activation of mast cells and enteric neurons / J.D. Xu, S. Liu, W. Wang [et al.] // *Br J Pharmacol*. – 2012. - Vol. 165, № 1. – P. 197-207.
160. Hardcastle J. Involvement of prostaglandins in histamine-induced fluid and electrolyte secretion by rat colon / J. Hardcastle, P.T. Hardcastle // *J Pharm Pharmacol*. – 1988. - Vol. 40, № 2. – P. 106–10.
161. Heuvelin E. A Bifidobacterium probiotic strain and its soluble factors alleviate chloride secretion by human intestinal epithelial cells / E. Heuvelin, C. Lebreton, M. Bichara [et al.] // *The Journal of nutrition*. – 2010. - Vol. 140, № 1. – P. 7–11
162. Raheja G. Lactobacillus acidophilus stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism / G. Raheja, V. Singh, K. Ma [et al.] // *Am J of Phys. Gastrointest and Liv Phys*. - 2010. - Vol. 298, № 3. – P. G395–401.
163. Lefebvre P. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation / P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2009. - Vol. 89, № 1. – P. 147–191.

164. McFarland L.V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients / L.V. McFarland // *World J. Gastroenterol.* — 2010. — Vol. 16, № 18. — P. 2202-2222.
165. Duman D.G. *Saccharomyces boulardii* ameliorates clarithromycin-and methotrexate-induced intestinal and hepatic injury in rats / D.G. Duman, Z.N. Kumral, F. Ercan [et al.] // *Br. J. Nutr.* — 2013. — № 2. — P. 1-7.
166. Czerucka D. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP-Ca²⁺-dependent CI- secretion in cells / D. Czerucka, P. Rampa // *Dig. Dis. Sci.* — 1999. — Vol. 44, № 11. — P. 2359 – 2368.
167. McFarland L.V. Metaanalysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease // *Am. J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 101, № 4. — P. 812822.
168. Геппе Н. А., Горелов А. В., Дронов И. А. Проблемы антибактериальной терапии при кишечных инфекциях у детей // *Медицинский совет.* - 2011. № 5. С. 22–26.
169. Плоскирева А. А., Горелов А. В., Усенко Д. В., Бондарева А. В., Тхакушинова Н. Х., Улуханова Л. У. Эффективность этиотропной терапии бактериальных острых кишечных инфекций у детей на современном этапе // *Инфекционные болезни.* 2011. Т. 9. № 4. С. 79–83.
170. Wang J.P. Expression of aquaporin 8 in colonic epithelium with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome / J.P. Wang, X.H. Hou // *Chin Med J (Engl).* — 2007. — Vol. 120, № 4. — P. 313-6.
171. Sonawane N.D. Luminally active, nonabsorbable CFTR inhibitors as potential therapy to reduce intestinal fluid loss in cholera / N.D. Sonawane, J. Hu, C. Muanprasat, A.S. Verkman // *The FASEB Journal.* — 2006. — Vol. 20, — № 1. — P. 130-132.
172. Ratnaik R.N. Mechanisms of drug-induced diarrhoea in the elderly / R.N. Ratnaik, T.E. Jones // *Drugs Aging.* — 1998. — Vol. 13, № 3. — P. 245-53.
173. Алехин Е.К. Как действуют антибиотики / Е.К. Алехин // *Соросовский*

образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 4.
<http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/973.html/>

174. Murphy J.L. Adverse Events in Pediatric Patients Receiving Long-term Oral and Intravenous Antibiotics. / J.L. Murphy, N. Fenn, L. Pyle [et al.] // *Hosp Pediatr.* – 2016. – Vol 6, № 6. – P. 330-8.
175. Puri B.K. The potential use of cholestyramine to reduce the risk of developing Clostridium difficile-associated diarrhoea in patients receiving long-term intravenous ceftriaxone / B.K. Puri, J.S. Hakkarainen-Smith, J.A. Monro // *Medical Hypotheses.* – 2015. - Vol. 84, № 1. P. 78–80.
176. Gareau M.G. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation / M.G. Gareau, J. Jury, G. MacQueen [et al.] // *Gut.* – 2007. – Vol. 56, № 11. – P. 1522–1528.
177. Gareau M.G. Fluid and electrolyte secretion in the inflamed gut: novel targets for treatment of inflammation-induced diarrhea / M.G. Gareau, K.E. Barrett // *Current opinion in pharmacology.* – 2013. – Vol. 13, № 6. – P. 895–9.
178. Spehlmann M.E. CXCR2-dependent mucosal neutrophil influx protects against colitis-associated diarrhea caused by an attaching/effacing lesion-forming bacterial pathogen / M.E. Spehlmann, S.M. Dann, P. Hruz [et al.] // *Journal of immunology.* – 2009. - Vol. 183, № 5. – P. 3332–43.
179. Marchelletta R.R. Altered expression and localization of ion transporters contribute to diarrhea in mice with Salmonella-induced enteritis / Marchelletta RR, Gareau MG, McCole DF [et al.] // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 145, № 6. – P. 1358–1368.
180. Ohland C.L. Escherichia coli-induced epithelial hyporesponsiveness to secretagogues is associated with altered CFTR localization / C.L. Ohland, R. DeVinney, W.K. MacNaughton // *Cellular microbiology.* – 2012. – Vol. 14, № 4. – P. 447–59.

181. Eutamene H. Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress / H. Eutamene, L. Bueno // *Gut*. – 2007. – Vol. 56, № 11. – P. 1495–7.
182. Heuvelin E. A bifidobacterium probiotic strain and its soluble factors alleviate chloride secretion by human intestinal epithelial cells / E. Heuvelin, C. Lebreton, M. Bichara [et al.] // *The Journal of Nutrition Biochemical, Molecular and Genetic Mechanisms*. – 2010. – Vol. 140. – P. 7–11.
183. Raheja G. *Lactobacillus acidophilus* stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism / G. Raheja, V. Singh, K. Ma [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2010. – Vol. 298, № 3. – P. 395-401.
184. Beaugerie L. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea / L. Beaugerie, J-C. Petit // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. – 2004. – Vol. 18, № 2. – P. 337–52.
185. Högenauer C. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea / C. Högenauer, H.F. Hammer, G.J. Krejs, E.C. Reisinger // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* – 1998. – Vol. 27, № 4. – P. 702–10.
186. Putnikov A. Mechanisms violation epithelial barrier of the colon of rats by long-acting antibiotic ceftriaxone / A. Putnikov, T. Dovbynychuk, J. Golota [et al.] // *Ukrainian biochemical journal*. – 2014. – Vol. 86, № 5. – P. 28.
187. Gustafsson J.K. Dynamic changes in mucus thickness and ion secretion during *Citrobacter rodentium* infection and clearance / J.K. Gustafsson, N. Navabi, A.M. Rodriguez-Piñeiro [et al.] // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8, № 12. – P. e84430. doi:10.1371/journal.pone.0084430
188. Tomas J. Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state / J. Tomas, J. Reygner, C. Mayeur [et al.] // *The ISME journal*. – 2015. – Vol. 9, № 1. – P. 46–58.
189. Wang J. Expression of aquaporin 8 in colonic epithelium with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome / J. Wang, X. Hou // *Chinese medical*

- journal. – 2007. – Vol. 120, № 4. – P. 313–6.
190. Sakai H. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon / H. Sakai, A. Sagara, K. Matsumoto [et al.] // *Pharmacological research*. – 2014. – Vol. 87. – P. 71–9.
191. Довбинчук Т.В. Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки / Т.В. Довбинчук, Т.М. Червінська, Л.В. Закордонець, Г.М. Толстанова // *Фізіологічний журнал*. – 2016. - Т. 62, № 1. – С. 94-100.
192. Bringiotti R. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? / R. Bringiotti, E. Ierardi, R. Lovero [et al.] // *World J Gastrointest Pathophysiol*. – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 550–9.
193. Kronman M.P. Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study / M.P. Kronman, T.E. Zaoutis, K. Haynes [et al.] // *Pediatrics*. – 2012. – Vol. 130, № 4. – P. e794–803.
194. Wlodarska M. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis / M. Wlodarska, B. Willing, K.M.Keeney [et al.] // *Infect Immun*. – 2011. – Vol. 79, № 4. – P. 1536–45.
195. Hansbro P.M. Importance of mast cell Prss31/transmembrane tryptase/tryptase- γ in lung function and experimental chronic obstructive pulmonary disease and colitis / P.M. Hansbro, M.J. Hamilton, M. Fricker [et al.] // *J Biol Chem*. – 2014. – Vol. 289, № 26. – P. 18214–27.
196. De Winter B.Y. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances / B.Y. De Winter, R.M. van den Wijngaard, W.J. de Jonge // *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. – 2012. – Vol. 1822, № 1. – P. 66–73.
197. Fox C.C. Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis / C.C. Fox, A.J. Lazenby, W.C. Moore [et al.] //

- Gastroenterology. – 1990. – Vol. 99, - № 1. – P. 119–24.
198. Довбинчук Т.В. Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за умов експериментального дизбіозу / Довбинчук Т.В., Закордонець Л.В., Путніков А.В. [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2015. – Т. 61, 6. – С. 76-85.
199. Wasserman S.I. Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line / S.I. Wasserman, K.E. Barrett, P.A. Huott [et al.] // Am J Physiol. – 1988. – Vol. 254, № 1. – P. 53–62.
200. Berschneider H.M. Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators / H.M. Berschneider, D.W. Powell // J Clin Invest. – 1992. – Vol. 89, № 2. – P. 484–9.
201. Deiteren A. Histamine H₄ and H₁ receptors contribute to postinflammatory visceral hypersensitivity / A. Deiteren, J.G. De Man, N.E. Ruysers [et al.] // Gut. – 2014. – Vol. 63, № 12. – P. 1873–82
202. Bozkurt A. Cefaclor, a cephalosporin antibiotic, delays gastric emptying rate by a CCK-A receptor-mediated mechanism in the rat / A. Bozkurt, M. Deniz, B.C.Yegen // Br J Pharmacol. – 2000. – Vol. 131, № 3. – P. 399–404.
203. Jernberg C. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota / C. Jernberg, S. Lofmark, C. Edlund // Microbiology. – 2010. – Vol. 156. – P. 3216–3223.
204. Holly H. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal / H. Holly, H. Jennifer, L. Eleanor [et al.] // Defences: Homeostasis and Immunopathology. – 2013. – Vol. 5. – P. 1869-1912.
205. Skochko N. Age related features water of electrolytes transport through the epithelium of rats colon and their correction with multiprobiotic ``Symbiter® acidophilus,, concentrated / N. Skochko, M. Cherpar, E. Torgalo [et al.] // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. - 2013. – Vol. 65, № 3 – С. 45-48.

206. Pylypenko S. Effect multiprobiotic "Apibact" on motor function of the colon in rats in conditions of prolonged hipoatsydnosti gastric juice / Pylypenko S., Beregova T.V., Kabanov A.V. // Bulletin problems of biology and medicine. – 2014. - Vol. 1, № 106. – P. 162-166.