

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ГОЛОТА ЮЛІЯ ВІКТОРІВНА

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

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

03.00.04 – біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

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

Київ – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	14
1.1. Сучасні дані щодо негативних наслідків антибіотикотерапії.....	14
1.1.1. Віддалені наслідки антибіотикотерапії.....	14
1.1.2. Біохімічні аспекти фармакологічної дії антибіотика цефалоспоринового ряду цефтриаксону.....	15
1.2. Коротколанцюгові жирні кислоти як основні метаболіти кишкової мікробіоти та їх значення для організму.....	18
1.2.1. Роль мембранних транспортерів у процесах обміну КЛЖК	22
1.2.2. Роль рецепторів КЛЖК у реалізації їх сигнальної функції...	23
1.3. Бар'єрна функція кишечника та механізми її порушення.....	27
1.3.1. Структура та роль слизового бар'єру кишечника.....	27
1.3.2. Роль оксидативного стресу в розвитку порушень бар'єрної функції кишечника.....	30
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	35
2.1. Реактиви та матеріали.....	35
2.2. Схема проведення дослідження.....	36
2.3. Визначення вмісту коротколанцюгових жирних кислот у дистальному відділі товстої кишки щурів методом газової хроматографії.....	37
2.4. Визначення загальної концентрації протеїнів у тотальному екстракті клітин слизової оболонки товстої кишки щурів за методом Бредфорда.....	38
2.5. Вестерн-блот	39
2.6. Визначення показників окисно-антиоксидантного балансу в слизовій оболонці товстої кишки щурів	41

2.6.1. Визначення каталазної активності	41
2.6.2. Визначення супероксиддисмутазної активності методом нативного електрофорезу в поліакриламідному гелі.....	42
2.6.3. Визначення вмісту ТБК-активних сполук	42
2.6.4. Визначення вмісту білкових тіолових груп	43
2.7. Визначення складу поверхневого слизу кишечника щурів.....	44
2.7.1. Визначення глікопротеїнів слизу за методом Шиф-реакції на PVDF-мембрані.....	45
2.7.2. Визначення загальної концентрації глікопротеїнів слизу.....	45
2.7.3. Визначення концентрації гексоз слизу орциновим методом	46
2.7.4. Визначення концентрації фукози слизу за методом Діше-Шеттлз.....	47
2.7.5. Визначення концентрації гексозамінів слизу.....	47
2.7.6. Визначення концентрації сіалових кислот слизу методом Гесса.....	48
2.8. Зимографія.....	49
2.9. Визначення проникності епітелію товстої кишки щурів.....	50
2.10. Моделювання експериментального коліту у щурів.....	50
2.11. Бактеріологічний аналіз мікробіоти мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів.....	52
2.11.1. Визначення транслокації бактерій у кров.....	53
2.12. Гістологічний аналіз товстої кишки щурів.....	53
2.12.1. Морфометричний аналіз гістологічних зрізів.....	53
2.12.2. Цитохімічне визначення келихоподібних і тучних клітин...	54
2.12.3. Імуногістохімічне дослідження рецепторів і транспортерів КЛЖК.....	54
2.13. Імуноферментний аналіз.....	55
2.14. Статистична обробка отриманих результатів.....	56

РОЗДІЛ 3. ВМІСТ КЛЖК ТА РІВЕНЬ КЛЖК-СПЕЦИФІЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ І ТРАНСПОРТЕРІВ У ДИСТАЛЬНОМУ ВІДДІЛІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ.....	57
3.1. Вміст КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.....	57
3.2. Вплив цефтриаксону на імуногістохімічну реактивність транспортерів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів...	65
3.3. Локалізація та рівень FFA2 та FFA3 рецепторів до КЛЖК в товстій кишці щурів після введення цефтриаксону.....	68
РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРИСТИКА БАР'ЄРНОЇ ФУНКЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ.....	73
4.1. Окисно-антиоксидантна рівновага в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.....	73
4.1.1. Активність процесів перекисного окиснення ліпідів та ферментів антиоксидантного захисту в слизовій оболонці товстої кишки щурів	73
4.1.2. Рівень редокс-чутливих транскрипційних факторів у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону	77
4.1.3. Рівень активації ERK1/2 та p38 MAP-кіназних шляхів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону	82
4.2. Зміни вуглеводного складу поверхневого слизу кишечника щурів після введення антибіотику цефтриаксону.....	84
4.3. Активність матриксних металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.....	91

РОЗДІЛ 5. СТУПІНЬ СПРИЙНЯТЛИВОСТІ ЩУРІВ ДО РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ У ВІДДАЛЕНІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ.....	96
5.1. Проникність епітелію товстої кишки щурів у віддалені терміни після введення цефтриаксону.....	96
5.2. Макроскопічні та морфометричні показники перебігу експериментального коліту у віддалені терміни після введення цефтриаксону.....	100
5.3. Рівень ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові щурів з експериментальним колітом у віддалені терміни після відміни цефтриаксону.....	106
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	110
ВИСНОВКИ.....	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	121

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню

ДСН – додецилсульфат натрію

ЕДТА– етилендіамінтетраоцтова кислота

ЗЗК – запальні захворювання кишечника

ІЛ-10 – інтерлейкін 10

КЛЖК – коротколанцюгові жирні кислоти

КУО – колонієутворююча одиниця

ММП – матриксна металопротеїназа

НСТ – нігросиній тетразолій

ПМН – поліморфоядерні нейтрофіли

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобабітурова кислота

ТЕМЕД – тетраметилетилендіамін

ФНП – фактор некрозу пухлин

ШКТ – шлунково–кишковий тракт

ERK1/2– extracellular signal-regulated kinases 1/2 (кінази, що регулюються позаклітинним сигналом 1/2)

Egr-1 – early growth response 1 (білок ранньої відповіді 1)

FFA2 (GPR 43) – free fatty acid receptor 2 (рецептор до вільних жирних кислот 2; G protein-coupled receptor 43 (рецептор, зв'язаний з G-білком 43)

FFA3 (GPR 41) – free fatty acid receptor 3 (рецептор до вільних жирних кислот 3; G protein-coupled receptor 41 (рецептор, зв'язаний з G-білком 41)

HIF1 α – hypoxia-inducible factor 1 α (фактор 1 α , що індукується гіпоксією)

МАРК – mitogen-activated protein kinases (протеїнкінази, що активуються мітогенами)

MCT – proton-coupled monocarboxylate transporter (H^+ -залежний транспортер монокарбонових кислот)

SMCT– sodium-coupled monocarboxylate transporter (Na^+ -залежний транспортер монокарбонових кислот)

Sp-1 – specificity protein-1 (специфічний білок-1)

ВСТУП

Актуальність теми. Антибіотики широко використовуються в сучасній клінічній практиці для лікування бактеріальних інфекцій [1-3]. Їх емпіричне призначення, а також швидкий розвиток бактеріальної резистентності часто вимагає корекції терапії, іноді до трьох видів антибіотиків [4]. Епідеміологічні дослідження показали, що використання антибіотиків суттєво підвищує ризик розвитку численних захворювань [5-7], в тому числі запальних захворювань кишечника (ЗЗК) [8-10]. Крім того показано, що антибіотики впливають на чутливість до інфекцій шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [11]. Оскільки підвищення сприйнятливості до різних захворювань може виникати на тлі використання широкого спектру антимікробних препаратів [12], очевидно, що причиною цього явища є не побічні реакції окремих груп антибіотиків, а загальні, притаманні всім групам властивості.

Відомо, що антибактеріальна терапія призводить до змін у складі кишкової нормобіоти, які є причиною розвитку порушень з боку ШКТ у 3-62% хворих [13]. Однак механізми взаємозв'язку цих порушень із підвищеним ризиком розвитку ЗЗК залишаються недостатньо з'ясованими. Припускають, що дисбаланс мікробіоти у зв'язку із застосуванням антибіотиків, може бути стійким і тривалий час впливати на імунну толерантність ШКТ та чутливість до патогенів, що сприяє розвитку запальних захворювань [9, 14-15].

В останні роки набуває актуальності вивчення процесів обміну низькомолекулярними метаболітами між мікробіотою і макроорганізмами. Одними з найважливіших метаболітів кишкової мікробіоти є коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) [16], фізіологічний ефект яких опосередковується КЛЖК-специфічними FFA2 та FFA3 рецепторами, зв'язаними з G-білками [17-19]. КЛЖК, особливо бутират, слугують

важливим джерелом енергії для клітин епітелію товстої кишки, забезпечуючи близько 60-70% їх енергетичних потреб. Вони регулюють перистальтику товстої кишки, рН кишкового вмісту, абсорбцію електролітів і поживних речовин [20], забезпечують підтримання бар'єрної функції кишечника через вплив на щільні контакти [21] та збільшення синтезу MUC2 [22]. Крім того, ці кислоти відіграють важливу роль в регуляції як локального, так і системного імунітету. Протизапальні функції КЛЖК реалізуються шляхом модуляції хемотаксису імунних клітин, регуляції вивільнення активних форм кисню і цитокінів [23-24]. У зв'язку з біологічною значимістю КЛЖК у підтриманні гомеостатичних показників функціонування ШКТ, вони є найбільш вірогідними посередниками в механізмах розвитку віддалених наслідків антибіотикотерапії.

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

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

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

Відповідно до зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

1. Визначити вміст КЛЖК дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.
2. Встановити рівень та локалізацію рецепторів і транспортерів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.
3. Дослідити стан окисно-антиоксидантного балансу, експресію редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, NIF1 α та рівень активації ERK1/2 і p38 MAP-кіназних шляхів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.
4. Визначити концентрацію глікопротеїнів та вуглеводний склад поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.
5. Дослідити показники бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів та їх чутливість до дії ульцерогенних чинників у віддалені терміни після введення цефтриаксону.

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

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

Методи дослідження. У роботі використовували біохімічні, хроматографічні, колориметричні, молекулярно-біологічні, імуногістохімічні, цитохімічні, гістологічні, бактеріологічні методи та методи варіаційної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше встановлено, що введення антибіотику цефалоспоринового ряду цефтриаксону призводить до тривалого зниження концентрації КЛЖК, яке асоційоване зі змінами у рівні КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів, що опосередковують ефект даних кислот на організм. Експериментально підтверджено, що введення антибіотику призводить до активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, HIF1 α та пов'язаних з ними ERK1/2 MAP-кіназ. Вперше встановлено, що у віддалені терміни після антибіотикотерапії характерною ознакою структури олігосахаридів молекул глікопротеїнів слизу є передчасне їх термінування, яке асоціюється зі зниженням концентрації гексоз і фукози та підвищенням сіалових кислот. Встановлено, що введення цефтриаксону впродовж 14 діб підвищує чутливість до розвитку експериментального коліту у віддалені терміни після введення антибіотику.

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

Практичне значення одержаних результатів. Отримані експериментальні дані є підґрунтям для: розробки рекомендацій щодо

моніторингу віддалених наслідків антибіотикотерапії у пацієнтів з хронічними інфекційними захворюваннями, які часто отримують антибактеріальні препарати і, відповідно, є групою ризику; пошуку профілактичних засобів для попередження цих наслідків, зокрема направлених на підтримання сталого рівня метаболічної активності кишкової мікробіоти та інтегративної цілісності кишкового бар'єру.

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

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

Публікації. За темою дисертації опубліковано 16 наукових робіт, що відбивають основний зміст дисертаційної роботи: 5 статей у фахових

наукових виданнях рекомендованих ДАК України (з яких 2 статті у наукових виданнях України, що включені до міжнародних наукометричних баз) та 1 стаття у нефармовому виданні, а також 10 тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні дані щодо негативних наслідків антибіотикотерапії

1.1.1. Віддалені наслідки антибіотикотерапії

Використання антибіотиків та інших хіміотерапевтичних засобів часто викликає істотні порушення мікробіоти ШКТ та організму в цілому [29]. Зміни складу нормобіоти можуть призводити до розладів процесів травлення: всмоктування поживних речовин, засвоєння іонів заліза та кальцію; втрати здатності до активації різних субстратів і ферментів вмісту ШКТ, розвитку гіпопротеїнемії та бактеріємії [30]. Це, в свою чергу, послаблює захисні механізми організму та створює несприятливий фон для перебігу захворювань як інфекційної так і неінфекційної природи [31], а за певних умов, може стати патогенетичним фактором для формування важких розладів [32].

З'являється все більше відомостей про те, що дисбаланс нормобіоти, у зв'язку із застосуванням антибіотиків, може бути стійким [14-15] і тривалий час впливати на імунну толерантність ШКТ та чутливість до патогенів, що сприяє розвитку запальних захворювань [8-10]. Так, Jernberg та ін. [33] показали, що пероральний прийом здоровими волонтерами (7 днів) антибіотика групи лінкозамідів кліндаміцину в клінічно рекомендованих дозах призводить до стійких порушень мікробного угруповання впродовж наступних 2-х років. Зокрема виявлялось різке зниження різноманітності і тривала персистенція резистентних штамів *Bacteroides*. Аналогічно в дослідженнях на мишах введення антибіотика цефалоспоринового ряду цефоперазону викликало суттєві зміни складу мікробіоти сліпої кишки мишей, які спостерігались навіть через 6 тижнів після припинення введення

препарату [34]. Dethlefsen зі співавт. [15] показали, що п'ятиденний прийом антибіотика з групи фторхінолонів цiproфлоксацину суттєво порушує склад кишкової мікробіоти на 3-4 добу введення. Однак мікробне угруповання не повертається до початкового стану навіть через тиждень після завершення антибіотикотерапії. Rashid зі співавт. [14] провели більш тривале дослідження і показали, що прийом здоровими волонтерами цiproфлоксацину або кліндаміцину впродовж 10 днів викликає зміни складу фекальної мікробіоти, які виявлялися впродовж 12 місяців після введення.

Однак всі ці дослідження проводились із пероральним застосуванням антибіотиків, тому відкритим залишається питання про віддалені наслідки введення антимікробних препаратів парентеральним шляхом.

1.1.2. Біохімічні аспекти фармакологічної дії антибіотика цефалоспоринового ряду цефтриаксону

На сьогодні в клінічній практиці часто використовуються широкоспектрові антибіотики, зокрема цефалоспорини [35], які селективно і необоротно інгібують синтез клітинної стінки бактерій шляхом блокування активності транспептидаз [36]. Цефтриаксон – напівсинтетичний антибіотик з групи цефалоспоринів III покоління для парентерального введення. Цей антибіотик набув широкого використання через високу антибактеріальну активність і низьку токсичність [35]. Цефтриаксон можна вводити внутрішньовенно та внутрішньом'язово до 4-6 тижнів без появи суттєвих побічних реакцій [37].

Цефтриаксон застосовується для лікування менінгіту, бактеріальних інфекцій дихальних шляхів, сечостатевих органів, кісток, суглобів, м'яких тканин, шкіри, а також раневих інфекцій [35]. Крім того, цей антибіотик використовують для передопераційної профілактики при хірургічних втручаннях на органах ШКТ, жовчовивідних та сечовивідних шляхів, гінекологічних операціях [38].

Цефтриаксон оборотно зв'язується з альбумінами плазми, тому високі концентрації препарату виявляються впродовж 24 годин в більшості тканин і рідин організму, в тому числі в легенях, серці, жовчевивідних шляхах, печінці, мигдаликах, середньому вусі, кістках; у рідинах організму: спинномозковій, плевральній і синовіальній рідині; а також у секреті простати [37]. Антибіотик проникає через плацентарний бар'єр, а також виділяється в грудне молоко. Цефтриаксон не метаболізується, виводиться з організму в незміненому вигляді, 50-60 % нирками і 40-50 % — з жовчю, проте може перетворюватись мікробіотою в неактивні метаболіти. Побічні ефекти антибіотика можуть проявлятися у вигляді нудоти, діареї, холестатичної жовтяниці, псевдомембранозного коліту та алергічних реакцій [38].

Бактеріологічні дослідження показали, що використання цефалоспоринів зменшує кількість анаеробних ентеробактерій і збільшує рівень аеробних коків у складі мікробіоти кишечника [39]. Зокрема, внутрішньом'язове введення цефтриаксону здоровим волонтерам впродовж п'яти днів призводило до істотного зниження загальної кількості колонієутворюючих одиниць анаеробних мікроорганізмів, що корелювало зі зниженням активності бактеріального ферменту β -аспартилпептидази у фекаліях [40]. Використання методу денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу для аналізу мікробіоти за умов тривалого (150 днів) перорального введення мишам натрієвої солі цефтриаксону показало, що на 8-му і 30-ту добу в складі кишкової мікробіоти переважають представники родів *Enterococcus* і *Robinsoniella*, а після 60 днів введення – *Anaeroplasm*, *Enterococcus*, *Robinsoniella* та *Escherichia* [41]. Отже, введення цефтриаксону призводить до пригнічення анаеробних мікроорганізмів та супутньої проліферації умовно-патогенних бактерій.

Також показано, що цефтриаксон-індуковані дисбіотичні порушення нормобіоти впливають на стан, як місцевого, так і системного імунітету. Концентрація імуноглобуліну G в сироватці та секреторного імуноглобуліну

А в слизовій кишки знижувались за умов тривалого введення цефтриаксону [41-42]. Пероральне введення цефтриаксону мишам впродовж 8 днів призводило до збільшення кількості дендритних клітин в слизовій оболонці тонкої кишки та зниження їх антигенпрезентувальних властивостей [43], що свідчить про порушення механізмів регуляції вродженої та адаптивної імунної відповіді. Показано, що за умов цефтриаксон-індукованого дисбактеріозу в лімфоїдній тканині, пов'язаній з кишечником, зокрема в Пейєрових бляшках, мезентеріальних лімфатичних вузлах та селезінці, підвищується частка Т-клітин, тоді як В-клітин, навпаки, знижується [42]. Тривале введення цефтриаксону збільшує співвідношення Т-хелперів (Тх1/Тх2), CD4/CD8 та знижує – CD4⁺/CD25⁺ [41]. Отже, введення цефтриаксону порушує імунний гомеостаз в кишечнику, що суттєво впливатиме на розвиток імунної відповіді.

Приєм антибіотиків може викликати стійкі порушення складу кишкової мікробіоти впродовж тривалого періоду після завершення антибіотикотерапії. Однак механізми розвитку та наслідки дисбіотичних змін у віддалені терміни після прийому антибіотиків не встановлені. Ведення широкоспектрового антибіотика цефалоспоринового ряду цефтриаксону пригнічує анаеробну ланку кишкової мікробіоти, що призводить до порушення локальних і системних імунних функцій. Проте відкритим залишається питання, чи можуть дані зміни підвищувати сприйнятливність організму до розвитку запальних захворювань.

1.2. Коротколанцюгові жирні кислоти як основні метаболіти кишкової мікробіоти та їх значення для організму

Особливу роль у процесі взаємодії нормальної мікробіоти та організму людини відіграють низькомолекулярні метаболіти мікроорганізмів, здатні суттєво впливати на перебіг численних фізіологічних процесів. Продуктами біосинтетичної діяльності кишкової мікробіоти є широкий спектр вітамінів, КЛЖК, коферментів, гормоноподібних та бактеріостатичних речовин, незамінних амінокислот, пептидів та ін., що визначають фізіологічні функції нормобіоти [44].

Одними з найважливіших метаболітів кишкової мікробіоти, які здійснюють як місцевий, так і системний вплив, є КЛЖК. КЛЖК – група насичених органічних кислот, що містять від двох до шести атомів вуглецю. Ацетат, пропіонат і бутират складають 95% КЛЖК синтезованих в кишечнику та присутні в молярному співвідношенні 60:20:20 [45]. Загальна концентрація КЛЖК максимальна в проксимальному відділі товстої кишки (70-140 мМ) в той час як в дистальному відділі їх концентрації нижчі (20-70 мМ) [46]. Кількість та співвідношення КЛЖК залежить від складу та метаболічної активності кишкової мікробіоти, наявності субстратів для їх синтезу та часу кишкового транзиту [16].

КЛЖК, особливо бутират, слугують важливим джерелом енергії для клітин епітелію кишки, забезпечуючи близько 60-70% їх енергетичних потреб [45]. Колоноцити мишей-гнотобіонтів мають виражений дефіцит мітохондріального дихання, зокрема знижені співвідношення NADH/NAD^+ та синтез АТФ, що призводить до аутофагії. Додавання бутирату до колоноцитів мишей-гнотобіонтів нормувало цей дефіцит мітохондріального дихання та запобігало їх аутофагії [47]. Ацетат і пропіонат, які надійшли у колоноцит, переважно виводяться у кровотік і транспортуються в печінку. Ацетат, за наявності ацетил-КоА синтетази, у цитоплазмі клітин жирної

тканини і молочних залоз використовується як субстрат для ліпогенезу та синтезу холестеролу. Показано, що прийом лактулози, яка є субстратом для синтезу КЛЖК мікробіотою, підвищує рівень холестеролу в сироваци крові [48]. Пропіонова кислота транспортується у печінку, де використовується в якості субстрату глюконеогенезу. Пропіонат може включатися в цикл Кребса на рівні сукциніл-КоА, що призводить до зниження вмісту в клітинах печінки інгібітора фосфофруктокінази, цитрату, та підсилює гліколіз [16]. Пропіонова кислота також може пригнічувати синтез холестеролу шляхом інгібування активності 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА синтази та 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА редуктази [49].

Проте, КЛЖК виступають не тільки в якості важливого джерела енергії, але також виконують різні фізіологічні функції в кишечнику, включаючи регуляцію моторики товстої кишки, рН шлунково-кишкового вмісту та абсорбції електролітів і поживних речовин [20]. Зниження рН в просвіті кишки за рахунок накопичення кислот пригнічує ріст умовно-патогенної мікробіоти. Це один з важливих механізмів саморегуляції складу й активності нормобіоти. Низький рівень рН підвищує доступність кальцію для зв'язування з вільними жовчними кислотами та знижує активність бактеріального ферменту 7 α -дегідроксилази, який здійснює перетворення первинних жовчних кислот у вторинні [50].

Крім того, КЛЖК виступають хімічними месенджерами. Вони відіграють важливу роль в регуляції як локального так і системного імунітету. Протизапальні функції КЛЖК реалізуються шляхом регуляції хемотаксису імунних клітин та вивільнення ними активних форм кисню і цитокінів. Так, показано, що бутират пригнічує вивільнення інтерлейкіну (ІЛ) 12 і підвищує – ІЛ-10 в людських моноцитах, стимульованих *Staphylococcus aureus* [23]. Попередня обробка клітин товстої кишки (HT-29 клітини) пригнічує індуковану фактором некрозу пухлин альфа (ФНП- α) ядерну транслокацію прозапального фактора транскрипції каппа-В (NF- κ B) [24]. Здатність КЛЖК пригнічувати NF- κ B знижується в

ряду бутират > пропіонат > ацетат в клітинах Colo320DM [51]. КЛЖК, зокрема пропіонат і бутират, інгібують експресію молекул адгезії, продукцію хемокінів і, отже, пригнічують рекрутинг моноцитів/макрофагів і нейтрофілів, що вказує на протизапальну дію. Проте, у місцях анаеробної бактеріальної інфекції або після втрати цілісності епітелію кишечника, високі концентрації КЛЖК можуть призводити до накопичення нейтрофілів і посилення запального процесу [52]. Ацетат сприяє вивільненню активних форм кисню нейтрофілами мишей [53]. Ці дані ілюструють подвійний ефект КЛЖК на регуляцію імунної відповіді.

Численними дослідженнями встановлено антиканцерогенну дію бутирату, однак механізм цього явища чітко не визначений. Бутират стимулює експресію білка $p^{21WAF1/cip1}$, який може блокувати клітинний цикл в G1 фазі, інгібуючи проліферацію [54]. Бутират і пропіонат здатні до епігенетичної регуляції генів через інгібування гістондеацетилаз [55], що призводить до збільшення ацетилювання залишків лізину гістонів та, як результат, впливає на характер експресії багатьох генів.

КЛЖК сприяють підтриманню бар'єрної функції кишки. Додавання в середовище масляної або пропіонової кислоти посилює експресію мРНК MUC2 і секрецію MUC2 лінією келихоподібних клітин людини LS174T [56]. Бутират збільшує трансепітеліальний електричний опір моношару клітин Сасо-2 шляхом прискорення збірки білків щільних контактів. Цей ефект був опосередкований активацією АМФ-залежної протеїнкінази (АМФК) [21]. Бутират дозозалежно підвищує транскрипційні рівні MUC3, MUC4 і MUC12, та секрецію слизу колоректальними LS174T клітинами людини, що супроводжується підвищенням експресії генів кіназ і транскрипційних факторів, які беруть участь в мітоген-активованих протеїнкіназних (МАРК) сигнальних шляхах [57].

Зниження рівня КЛЖК у фекаліях є типовим для хворих на ЗЗК. Roediger та ін. [58] показали, що колоноцити пацієнтів з виразковим колітом характеризуються зниженням окиснення бутирату в порівнянні з

контрольною групою. Це дослідження було першим, яке виявило, що місцевий дефіцит поживних речовин може призводити до запалення та розвитку коліту. Ці результати були підтверджені за допомогою спектроскопії ядерного магнітного резонансу [59], а також високоефективної рідинної хроматографії [60], які показали суттєве зниження рівня ацетату, пропіонату і бутирату у фекаліях пацієнтів із ЗЗК порівняно зі здоровими особами. Ректальне ведення КЛЖК призводило до помітного поліпшення перебігу захворювання [61]. Проте, інше дослідження з використанням того ж розчину КЛЖК для лікування пацієнтів з дивертикулярною хворобою товстої кишки [62] не показало ендоскопічних чи гістологічних змін впродовж 2 тижнів. Поясненням цього явища може бути пригнічення всмоктування та окиснення КЛЖК колоноцитами через низький рівень коензиму А, який необхідний для окиснення жирних кислот. Висловлено припущення, що останній може знижуватись в результаті підвищеної продукції сірковмісних сполук кишковою мікробіотою [63]. Пероральний прийом бутирату (4 г/доба) впродовж 8 тижнів, у вигляді капсули, вкритої кишковорозчинною оболонкою, призводив до полегшення клінічного перебігу та ремісії 53% пацієнтів з хворобою Крона, що супроводжувалось зниженням рівнів NF-кВ та IL-1b в слизовій оболонці кишки [64]. Введення бутирату знижувало інфільтрацію нейтрофілів за умов експериментального коліту у мишей, індукованого декстрансульфатом натрію [65].

Отже, все більше доказів підтверджують виняткову роль мікробіоти кишечника в підтриманні здоров'я організму та розвитку захворювань. Цей вплив здійснюється через продукцію КЛЖК, які є основними бактеріальними метаболітами під час ферментації харчових волокон. Найвищі рівні КЛЖК виявлено в проксимальному відділі товстої кишки, де вони використовуються локально ентероцитами або транспортуються через епітелій кишки в кровотік. Показано, що КЛЖК суттєво впливають на хемотаксис і фагоцитоз та викликають вивільнення активних форми кисню

імунними клітинами, мають протизапальну, протипухлинну дію та беруть участь в підтриманні цілісності кишкового бар'єру.

1.2.1. Роль мембранних транспортерів у процесах обміну КЛЖК

Синтез КЛЖК здійснюється мікрорганізмами в кишечнику, однак ці метаболіти були виявлені в печінці, ворітній вені та системному кровотоці. Відомо, що майже 90-95% синтезованих КЛЖК всмоктуються і лише 5-10% виділяються з фекаліями [16]. Всмоктування КЛЖК може здійснюватись шляхом дифузії недисоційованих молекул або транспорту аніонів КЛЖК за участю мембранних транспортерів. Враховуючи, що pK_a для КЛЖК складає близько 4,8, а рН просвіту товстої кишки близько 6,0 (рН 5,5-6,5), тільки незначний відсоток КЛЖК може перебувати в недисоційованому стані [45]. Основна частина КЛЖК транспортується через мембрани клітин кишкового епітелію за участю H^+ -залежних та Na^+ -залежних транспортерів монокарбонових кислот, МСТ і SMCT відповідно, що здійснюють котранспорт аніонів КЛЖК з катіонами [66].

МСТ (SLC16) – мембранозв'язані канали, що транспортують лактат, кетонові тіла та інші монокарбонові кислоти, спряжено з протонами (1:1), за градієнтом концентрації. Родина МСТ транспортерів налічує більше 14 підтипів, кожен з яких має дванадцять трансмембранних доменів [67]. МСТ1 транспортери експресуються по всьому кишечнику, від шлунка до прямої кишки. При цьому інтенсивність експресії вища в товстій кишці, зокрема в сліпій кишці гризунів, що корелює з максимальною продукцією КЛЖК. МСТ2 експресуються переважно на базолатеральній мембрані парієтальних клітин шлунка та не виявляються в інших відділах ШКТ [66]. МСТ4 і МСТ5 також переважно локалізуються в дистальному відділі товстої кишки, тоді як МСТ3 – на клітинах тонкої кишки людини. Інші підтипи МСТ транспортерів розповсюджені по різних органах, де беруть участь в транспорті лактату і кетонових тіл, та не виявляються в ШКТ. Переважна локалізація цих

транспортерів на базолатеральній мембрані ентероцитів [68] дозволяє припустити їх важливу роль для транспорту КЛЖК у кров.

На відміну від МСТ, Na^+ -залежні транспортери КЛЖК, SMCT1 (SLC5A8) та SMCT2 (SLC5A12), характеризуються переважною локалізацією на апікальній мембрані клітин та забезпечують всмоктування монокарбонних кислот з просвіту кишки або ниркових каналців [69]. Транскрипція SMCT1 у мишей виявляється в дистальних відділах клубової кишки та по всій товстій кишці [66].

Транспорт КЛЖК за участю SMCT1 здійснюється шляхом симпорту з Na^+ в стехіометричному співвідношенні 1:2, що стимулює всмоктування СГ та води в кишці [45]. Спорідненість SMCT1 до своїх основних субстратів змінюється в порядку: бутират > пропіонат > лактат >> ацетат [66]. Зниження експресії SMCT1 було показано під час канцерогенезу в кишечнику. Оскільки SMCT1 характеризується високою спорідненістю до бутирату, можна припустити, що цей транспортер опосередковує антиканцерогенний ефект КЛЖК [20].

Транспорт за участю SMCT2 – електронейтральний зі співвідношенням Na^+ : монокарбонна кислота як 1:1. Експресія SMCT2 була виявлена в тонкій кишці мишей, та не детектувалась в товстій [69]. Оскільки рівень КЛЖК в тонкій кишці значно нижчий, припускають, що SMCT2 здійснює транспорт ацетату, лактату та інших монокарбонних кислот, які надходять в організм з продуктами харчування [66].

Отже, механізми транспорту КЛЖК в клітини передбачають участь МСТ та SMCT транспортерів, що опосередковують ефект даних кислот на організм.

1.2.2. Роль рецепторів КЛЖК у реалізації їх сигнальної функції

У 2003 р. трансмембранні домени поліпептидів GPR41 і GPR43 були ідентифіковані як рецептори, зв'язані з G-білками, які активуються КЛЖК

[17-19]. Після цього відкриття, різко відновився інтерес до фізіологічної ролі КЛЖК та їх рецепторів. GPR41 і GPR43 було перейменовано на FFA3 і FFA2 (free fatty acid), відповідно, на основі їх здатності зв'язуватись з КЛЖК [70].

Амінокислотна послідовність FFA2 і FFA3 гомологічна на 43% [70], що свідчить про низьку селективність до лігандів між цими рецепторами. Проте, FFA2 рецептори мають вищу спорідненість до КЛЖК ніж FFA3. Сила зв'язування FFA2 людини до різних КЛЖК змінюється в ряду $C2=C3>C4>C5=C1$, тоді як для FFA3 – $C3=C4=C5>C2>C1$ [71]. Це означає що ацетат є набагато сильнішим активатором FFA2 ніж FFA3, в той час як бутират, навпаки, активує FFA3. Карбоксильна група КЛЖК є ключовим елементом у зв'язуванні цих ендогенних молекул з рецепторами, оскільки незаряджені естери КЛЖК виявились неактивними [18]. Результати вивчення амінокислотної послідовності показали наявність трьох позитивно заряджених амінокислот, які необхідні для впізнавання КЛЖК FFA2 і FFA3 рецепторами: аргінін в трансмембранних доменах 5 і 7 (Арг 5,39; Арг 7,35) та гістидин в четвертому домені (Гіс 4,56). Показано, що гістидин в положенні 4,56 безпосередньо не залучений до зв'язування карбоксильних груп, але забезпечує селективність рецепторів до довжини ланцюга жирних кислот [70].

З точки зору внутрішньоклітинної передачі сигналу FFA2 є змішаним рецептором, який має здатність зв'язуватись з $G\alpha_{i/o}$ та $G\alpha_{q/11}$ білками [17-19]. Передача сигналу від FFA3 рецепторів, спряжена тільки з $G\alpha_{i/o}$ білками [17-18]. Крім того, взаємодія КЛЖК з FFA2 рекрутує β -арестин-1 та β -арестин-2 до рецептору, які відповідальні за інтерналізацію FFA2 в клітину та здійснення трансдукції сигналу незалежно від G-білків [72].

Найбільша експресія мРНК FFA2 була виявлена в імунних клітинах, таких як моноцити, В-лімфоцити і поліморфоядерні нейтрофіли (ПМН) [18]. Нещодавні дослідження підтвердили наявність FFA2 на нейтрофілах, еозинофілах [53], а також лейкоцитах слизової оболонки кишки [73]. Крім

того, значна експресія мРНК FFA2 була виявлена в жировій тканині, кістковому мозку, селезінці, підшлунковій залозі та в товстій кишці.

FFA3 рецептори мають більш широкий паттерн експресії порівняно з FFA2, з найвищою в жировій тканині, селезінці, підшлунковій залозі, кишечнику. Факт присутності FFA3 на імунних клітинах залишається суперечливим [17, 53].

Дослідження з використанням флуоресцентно мічених L-клітин вказують на високий рівень експресії FFA2 в L-клітинах товстої, а FFA3 – L-клітинах тонкої кишок [74]. FFA3 частково колокалізуються з гастрином та греліном в шлунку, і повністю – з холецистокініном, глюкозо-залежним інсулінотропним поліпептидом (GIP) і секретином в проксимальному відділі тонкої кишки, з пептидом тирозин-тирозин (PYY), нейротензином і глюкагонподібним пептидом 1 (GLP-1) в дистальному відділі тонкої кишки. Градієнт експресії FFA3 в D-клітинах і ентерохромафінних клітинах збільшується в дистальному напрямку [73]. Відповідно, зв'язування КЛЖК з FFA2 і FFA3 рецепторами ентероендокринних клітин може стимулювати вивільнення GLP-1 [73], GLP-2 [75], PYY та GIP [76]. Показано, що агоністи FFA2 стимулюють вивільнення 5-гідрокситриптаміну ентерохромафінними клітинами, який разом з GLP-2 запобігає ушкодженню слизової оболонки кишечника [75]. Отже, FFA2 і FFA3 рецептори беруть участь в регуляції виділення гормонів ентероендокринними клітинами.

Особливий інтерес викликає роль цих рецепторів у регуляції перебігу запалення в кишечнику. Maslowski та ін. [53] виявили, що перебіг запалення у кишечнику мишей-гнотобіонтів полегшувався при введенні ацетату та його зв'язуванні з FFA2 рецепторами, в той час як Sina зі співавт. [77] показали, що КЛЖК стимулюють рекрутинг ПМН через зв'язування з FFA2, що збільшує пошкодження тканин. Більшість досліджень припускають, що КЛЖК пригнічують вивільнення прозапальних та активують вивільнення лейкоцитами протизапальних цитокінів. Зокрема пропіонова кислота може індукувати вивільнення протизапального інтерлейкіну-10 з регуляторних T-

клітин через FFA2-опосередкований механізм [78]. Миші, нокаутовані за FFA2 та FFA3 не рекрутували Т-хелпери 1 на моделі ректального запалення [79]. З точки зору клітинної сигналізації, ацетат і пропіонат, але не бутират [18, 53], підвищують концентрацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} в ПМН через активацію FFA2 і $\text{G}\alpha_{q/11}$. ПМН потребують кальцій для хемотаксису у відповідь на N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланін та використовують активні форми кисню (АФК) в фагосомах для знищення бактерій. Крім того АФК виступають в якості сигнальних молекул, що беруть участь в хемотаксисі. Масляна кислота пригнічує продукцію АФК в нейтрофілах, стимульованих N-форміл-Мет-Лей-Фен, в той час як оцтова – активує [80]. Макрофаги, що не мають FFA2, не виробляють АФК [81]. Отже, ацетат і пропіонат стимулюють, в той час як бутират пригнічує різні функції імунних клітин. Це може бути поясненням суперечливих результатів щодо використання сумішей КЛЖК для лікування ЗЗК.

Експресія як FFA2 так і FFA3 рецепторів виявлена на β -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Показано, що ацетат посилює секрецію інсуліну через активацію FFA2, тоді як пропіонат, навпаки, пригнічує секрецію через FFA3 рецептори [82]. Існують також переконливі докази наявності FFA2 на адипоцитах [17-18]. Наявність мРНК FFA3 показана в жировій тканині та клітинних лініях адипоцитів [17]. Показано, що КЛЖК гальмують ліполіз. Цей ефект відсутній у FFA2-нокаутованих мишей [83].

Експресія FFA3 виявлена також на клітинах нервової системи. Припускають, що КЛЖК можуть діяти через FFA3 в якості модулятора симпатичної регуляції енергетичного обміну. FFA3 експресується як превертебральними так і паравертебральними гангліями [84]. FFA3-нокаутовані миші мають нижчу частоту серцевих скорочень під час спокою, в той час як введення пропіонату мишам контрольної групи може підвищувати частоту серцевих скорочень. FFA3 також експресується в

гангліях ентэральнай нервовай сістэмы [73]. Фізіялагічная функцыя FFA3 у цих гангліях досі не апісана.

Отже, FFA2 (GPR43) та FFA3 (GPR41) рэцэптары спецыфічна актывуюцца КЛЖК, што ё прадуктамі метаболізму мікробіёты кішечніка. Проте, наявність FFA2 і FFA3 на панкреатычных β -кліцінах, FFA3 на нейронах, і FFA2 на лейкоцытах і адіпоцытах свідчыць, што біялагічная роля цих рэцэптарів, ймовірна, выходіць за рамкі рэгуляцыі віділення пептыдных гармонів ентэроендокрыннымі кліцінамі кішечніка. Ці дані вказуюць на важліву роля КЛЖК у підтрыманні гомеостазу не тількі ШКТ, а ўсяго арганізму.

Вывчэння працэсів абміну нязькомалекулярнымі метаболітамі між індыгеннай мікробіётай і макраарганізмамі ё надзвычайна актуальным на сьгодні. Відома, што да метаболітів, відповідальных за энергазабеспечэння епітэлію, пастачання субстратів ліпогенезу та глюконеогенезу, підтрымання іоннага абміну, актывацыі місцэвага імунітэту, тощо, відносяць КЛЖК. Відкрыття рэцэптарів і транспартерів КЛЖК та іх актывасія на рідных кліцінах макраарганізму підтвэрдыла важліву роля нормабіёты у работі багатыах арганів і сістэм. Це дазваляе прыпусціць, што КЛЖК та іх рэцэптары і транспартеры могуць браты участь у патогенезі функцыянальных порушэнь унаслідок актывіотыкотэрапіі.

1.3. Бар'єрна функцыя кішечніка та механізмы іі порушэння

1.3.1. Структура та роля слізавога бар'єру кішечніка

Велічэзна паверхня епітэлію слізавоі аболонкі шлунква-кішквога тракту вкынуе спецыялізавані функцыі травлення, всмоктування і здійсноу

виділення. Ці процеси повинні співіснувати з одночасною необхідністю забезпечити бар'єр щодо мікроорганізмів, які розщеплюють неперетравлені речовини просвіту кишки, та потенційних вірусних, бактеріальних і еукаріотичних патогенів [85]. Результатом спільної симбіотичної взаємодії клітин епітелію ШКТ та мікробіоти є формування складної специфічної структури – приепітеліального слизового бар'єру кишечника, який складається з слизу, секретованого келихоподібними клітинами, молекул секреторного IgA, нормальної мікробіоти та її метаболітів і захищає слизову оболонку від деградації, фізичної і хімічної агресії, адгезії патогенних мікроорганізмів, дії бактеріальних та інших токсинів [85-86].

Товщина слизового шару відрізняється в різних відділах ШКТ від 150-300 мкм в тонкій кишці до 700 мкм в шлунку і товстій кишці [85]. На поверхні слизової оболонки товстої кишки слиз формує два шари: внутрішній шар позбавлений мікробіоти, і зовнішній – колонізований мікроорганізмами [87].

Основним високомолекулярним компонентом слизу є глікопротеїни (муцини). На сьогодні ідентифіковано близько 20 різних генів муцинів, від MUC1 до MUC20, відповідно до порядку їх відкриття. Всі муцини поділяють на дві групи: секреторні (гель-формуєчі) муцини, такі як MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC19, та мембранозв'язані (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4 та ін.), які локалізовані на апікальній мембрані ентероцитів. Головним секреторним муцином тонкої і товстої кишки є MUC2 [85]. Білкова частина молекули муцину характеризується наявністю тандемних повторів (*variable number tandem repeats, VNTR*), що містять велику кількість амінокислотних залишків серину і треоніну до яких приєднуються олігосахариди. О-глікозилювання відбувається в апараті Гольджі приєднанням N-ацетилгалактозаміну (GalNAc) до гідроксильних груп серину і треоніну, формуючи GalNAc α 1-O-S/T (Tn антиген). Цей глікан далі подовжується в положеннях C3 або C6 GalNAc формуючи корові структури. Типовою особливістю молекул O-гліканів MUC2 людини є приєднання сіалової

кислотив С6 положенні GalNAc. В результаті, С6 гілка термінується. Олігосахарид послідовно подовжується в С3 положенні залишками N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) та галактози (Gal) [88]. Глікопротеїни кишечника щурів містять 4 типи корових структур: I тип - Gal β 1-3GalNAc α 1-; II тип - Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-; III тип - GlcNAc β 1-3-GalNAc α 1-; і IV тип - GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1- [89].

Глікани складають 60-80% маси молекули муцину. Вони покривають білковий остов і тим самим захищають муцини від деградації протеолітичними ферментами та впливають на їх гель-формуючі властивості. Термінальні олігосахариди є потенційними лігандами для мікробних адгезинів та поживним субстратом для симбіотичних бактерій зовнішнього шару слизу [85].

Важливість правильного глікозилювання муцинів була показана на моделях мишей з нокаутуваними генами глікозилтрансфераз. Так, миші, нокаутовані по β 1,3-N-ацетилглюкозамінілтрансферазі (C3GnT), яка приєднує залишок GlcNAc до Tn антигену (GalNAc α 1-S/T) з утворенням корової структури III типу, стають більш сприйнятливими до розвитку запалення товстої кишки, зокрема на моделі декстрансульфат натрій (DSS) – індукованого коліту [90]. У мишей, нокаутуваних по β 1,3-галактозилтрансферазі (C1GalT1, або T-синтаза) в дистальних відділах товстої кишки спонтанно розвивається коліт [91].

В термінальному положенні олігосахаридів муцинів локалізуються залишки фукози, сіалових кислот та сульфатовані моносахариди [88]. Сульфатування та сіалування олігосахаридів муцинів забезпечує додаткову стійкість слизу до руйнування бактеріальними глікозидазами [92-93]. Тому не тільки кількість, але і якість слизу має вирішальне значення для забезпечення бар'єрної функції.

Нормальна деградація гліканів слизу є відносно повільним процесом, але якщо вони стають короткими, то розпад олігосахаридів значно

пришвидшується і руйнується не лише зовнішній, а і внутрішній шар слизу через який бактерії можуть потрапити до поверхні епітелію [94].

Порушення слизового бар'єру може відігравати важливу роль в патогенезі ЗЗК, зокрема виразкового коліту [94-95]. Роль слизу в патогенезі ЗЗК наочно продемонстровано на моделі MUC2-нокаутних мишей, у яких спонтанно розвиваються важка форма коліту [96]. Руйнування слизового бар'єру дозволяє бактеріям контактувати безпосередньо з епітелієм [97]. Надмірна дія мікробних антигенів супроводжується вивільненням епітеліальними клітинами запальних цитокінів та хемокінів, що призводить до рекрутингу і активації лейкоцитів. Активовані нейтрофіли виділяють ряд протеаз, які порушують структуру і функції епітеліальних міжклітинних контактів. Як результат, ці зміни можуть призводити до розвитку запалення [95, 98].

1.3.2. Роль оксидативного стресу в розвитку порушень бар'єрної функції кишечника

Активні форми кисню (АФК) та оксид нітрогену постійно утворюються в ШКТ під впливом факторів зовнішнього середовища, резидентних імунних клітин, кишкової мікробіоти. Дві основні ферментативні реакції генерують АФК в ШКТ – ксантиноксидоредуктазна та НАДФН-оксидазна. Ксантиноксидоредуктаза, концентрація якої найвища в ШКТ, разом з численними фагоцитуючими клітинами та каталазонегативними бактеріями генерують велику кількість супероксидних радикалів ($O_2^{\cdot-}$) в товстій кишці [99].

Оскільки синтез АФК відбувається конститутивно, у відповідь організм має потужну систему антиоксидантного захисту, до якої належать ензиматичні та неензиматичні механізми. Основними ензиматичними антиоксидантами, що забезпечують ефективний захист від АФК, є

супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза [100]. Антиоксиданти видаляють вільні радикали та інгібують ініційовані ними процеси окиснення.

В останні роки зростає увага щодо ролі оксидативного стресу в патогенезі ЗЗК. ЗЗК асоціюються з дисбалансом між утворенням вільних радикалів і реактивних метаболітів та їх елімінацією антиоксидантною системою захисту [101-103]. Супероксидні радикали, перикис водню та гідроксильні радикали, що секретуються нейтрофілами та фагоцитами, акумулюються в ділянках запалення та інтенсифікують перикисне окислення ліпідів (ПОЛ) викликаючи тим самим зниження стабільності клітинних мембран та загибель клітин. З іншого боку, надлишок АФК може викликати запалення стимулюючи ПМН. Ці активовані клітини продукують ряд медіаторів запалення, таких як токсичні метаболіти кисню, лізосомальні ферменти та похідні арахідонової кислоти [104].

Основними мішенями впливу АФК є білки та ліпіди, зокрема, білки цитоскелету та щільних контактів. Наслідком такого впливу є порушення бар'єрної функції, яке, зокрема, може спричинити підвищення проникності слизової оболонки ШКТ із наступним розвитком запалення і численних захворювань ШКТ [100]. Зокрема показано, що H_2O_2 знижує трансепітеліальний електричний опір Caco-2 і T84 моношарів клітин. Це супроводжувалось збільшенням проникності для [3H] маніту, що вказує на H_2O_2 -індуковане збільшення парацеллюлярної проникності. Додавання інгібіторів тирозинфосфатаз знижувало трансепітеліальний електричний опір, однак збільшувало проникність до маніту. Це свідчить, що фосфорилування тирозину білкових молекул парацеллюлярного з'єднувального комплексу лежить в основі механізмів H_2O_2 -індукованого збільшення парацеллюлярної проникності [105]. Це було підтверджено Dixit зі співавт. [106], які показали, що оксидативний стрес, змодельований введенням H_2O_2 , збільшує проникність кишечника для атенололу, який транспортується парацеллюлярно та не впливає на трансцеллюлярну проникність метопрололу. Також показано, що оксидативний стрес активує

каспазу-3, що викликає апоптоз клітин слизової оболонки кишечника та дисфункцію кишкового бар'єру [107].

Однак, крім токсичної дії при патологічних процесах, дуже важливою є роль АФК в рецептор-опосередкованих шляхах передачі сигналів. АФК залучені у передачу сигналу від ряду цитокінів, зокрема, інтерлейкінів, інтерферону, тромбоцитарного фактору росту, епідермального фактору росту, трансформуючого фактору росту b-1, фактору некрозу пухлин, фактору росту нервів, епідермального фактору росту і фактору росту тромбоцитів тощо [108]. Відомо, що АФК здатні впливати на внутрішньоклітинні системи трансдукції сигналу двома шляхами: через зміну внутрішньоклітинного редокс-статусу клітини та через окисні модифікації білків. АФК можуть змінити структуру й функцію білків, модифікуючи амінокислотні залишки у межах функціональної області білків. Наприклад сульфгідрильна група (-SH) окремого залишку цистеїну може бути окисненою з утворенням -SOH, -SO₂H, -SO₃H та -SSG похідних. Такі альтерації можуть змінити активність ферменту, якщо цистеїн розташований у межах його каталітичної області або здатність фактора транскрипції зв'язуватись з ДНК, якщо він розміщений у межах його ДНК-зв'язуючої ділянки. Відновлення критичних цистеїнових залишків у деяких факторах транскрипції викликає їх прикріплення до ДНК і трансактивацію [109]. Зокрема, показано важливу роль у патогенезі ЗЗК активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 [110].

Важливою ланкою участі АФК у шляхах сигнальної трансдукції є їх роль у процесах фосфорилування білків. Найбільш точно сьогодні вивчено вплив АФК на функціонування систем тирозинкіназ/фосфатаз та серин/треонінкіназ/фосфатаз. Високі концентрації пероксиду водню й сильні прооксидантні зміни у внутрішньоклітинному тіол/дисульфідному співвідношенні призводять до підвищення фосфорилування тирозину в численних білках в результаті окисного інгібування тирозинових протеїн фосфатаз [111]. АФК безпосередньо та опосередковано регулюють

функціонування мітоген-активованих протеїнкіназних (МАРК) сигнальних каскадів за рахунок фосфорилування серинового й/або треонінового залишку в активному центрі ферментів. Активовані МАР-кінази переміщуються до ядра, де вони фосфорилують білки-мішені, пов'язані з функціонуванням факторів транскрипції [112]. Оксиданти збільшують активність МАР-кіназ у нейтрофілах, беручи участь у регуляції імунної відповіді організму. Таким чином, оксиданти, збільшуючи активність різних протеїнкіназ, беруть участь у регуляції численних клітинних процесів, таких як клітинна адгезія, проліферація, сигнальна трансдукція, апоптоз і т.д.

Отже за умов тривалого оксидативного стресу АФК можуть суттєво змінювати структурні та функціональні властивості клітини, що призводить до порушення бар'єрної функції епітелію кишечника.

ШКТ вистелений одношаровим епітелієм та приепітеліальним шаром поверхневого слизу, який утворює динамічний, проникний бар'єр, що дозволяє селективне поглинання поживних речовин, однак обмежує доступ патогенів і харчових антигенів. Цілісність та стійкість слизового бар'єру залежить від балансу про- і протизапальних факторів. Оксидативний стрес та активовані ним сигнальні шляхи можуть призводити до пошкодження епітеліального бар'єру і розвитку патологічного запалення слизової, що є важливим патогенетичним механізмом розвитку ЗЗК. Проте стан слизового бар'єру кишечника та окисно-антиоксидантний баланс клітин слизової оболонки товстої кишки за умов антибіотикосоцітованих дисбіотичних змін не досліджувався раніше.

Узагальнюючи наведені літературні дані, на сьогодні достеменно відомо, що антибіотики призводять до стійких порушень складу нормобіоти кишечника, які є причиною розладів функціонування ШКТ та можуть

підвищувати сприйнятливість до розвитку ЗЗК. Однак механізми, що лежать в основі даного взаємозв'язку є гіпотетичними та потребують емпіричного доказу. Порушення кишкового бар'єру є одним з ключових чинників патогенезу ЗЗК. Мікробіота відіграє визначну роль у формуванні та підтриманні його цілісності за участю основних метаболітів, КЛЖК, які є об'єднуючою ланкою між мікробіотою та макроорганізмом та відповідають за енергозабезпечення епітелію, підтримання бар'єрної функції кишечника та активацію місцевого імунітету. Це дозволяє припустити, що порушення бар'єрної функції кишечника є основним фактором віддалених наслідків антибіотикотерапії. Проте віддалені наслідки прийому терапевтичних доз антибіотиків на гомеостатичні показники функціонування кишкового бар'єру не досліджувались. Відповідям на поставлені питання була присвячена дана дисертаційна робота.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви та матеріали

У роботі були використані: стандарти оцтової, масляної, ізомасляної, пропіонової, валер'янової, ізовалеріанової та гексанової кислот ("Sigma-Aldrich", Німеччина); 4-метилвалеріанова кислота ("Sigma-Aldrich", Німеччина); N-ацетилнейрамінова кислота ("Sigma-Aldrich", США); Laemmli буфер для зразків ("Sigma-Aldrich", США); інгібітори протеїназ і фосфатаз (1 мкМ ортованадат натрію), ("Sigma-Aldrich", США); маркер молекулярної маси білків (20-120 кДа), (Prestained Protein MW Marker №26612, "CHEMICON International, Inc." США); трис-HCl ("Sigma-Aldrich", США); етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) ("Sigma-Aldrich", США); тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД) ("Sigma-Aldrich", США); тритон X-100 ("Sigma-Aldrich", США); бичачий сироватковий альбумін ("Sigma-Aldrich", США); кумасі блакитний R-250 ("Sigma-Aldrich", США); додецилсульфат натрію (ДСН) ("Sigma-Aldrich", США); люмінол ("Amersham Biosciences", США); диференційно-діагностичні середовища з селективними властивостями для культивування мікроорганізмів ("HiMedia", Індія); йодоацетамід ("Sigma", США); N-ацетил-1-цистеїн ("Sandoz", Швейцарія); метилцелюлоза ("Sigma", США); уретан ("Sigma-Aldrich", США); нітроцелюлозна мембрана Hybond-ECL ("Amersham Biosciences", США); PVDF-мембрана (Hybond-P, "Amersham International", LittleChalfont, Велика Британія). Інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а ("Хімлаборреактив", Україна).

2.2. Схема проведення дослідження

Дослідження проведені на білих лабораторних нелінійних щурах-самцях (140-160 г, $n = 184$), які утримувались за стандартних умов щодо температури (21-23 °C), освітлення (12/12 год), вологості (30–35%) та раціону харчування (повнораціонний корм для лабораторних тварин К-12-4) акредитованого віварію Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка відповідно до “Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)”. Проведення експериментів здійснювали згідно вимог біоетичної комісії Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №8 від 2 листопада 2015 р.). Початком експерименту вважався перший день введення діючої або контрольної речовини.

Тваринам щодня впродовж 14 діб внутрішньом'язово вводили цефтриаксон (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна) у дозі 300 мг/кг ($n = 80$). Для визначення рівня редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 цефтриаксон вводили впродовж 5 діб ($n = 6$). Тваринам контрольної групи ($n = 78$), відповідно, 0,1 мл води для ін'єкцій. Фекалії для бактеріологічного аналізу відбирали на 1, 15, 29 та 72 добу від початку експерименту, газохроматографічний аналіз КЛЖК у фекаліях проводили на 15 та 72 добу експерименту.

Щурів виводили з експерименту на 6, 15, 29 та 72 добу від початку дослідження шляхом інгаляції CO₂ з подальшою цервікальною дислокацією. Під час аутопсії зважували сліпу кишку та видаляли ділянку товстої кишки від анального отвору до сліпої кишки. Видалену ділянку розрізали в поздовжньому напрямку, промивали в охолодженому фізіологічному розчині та злегка промокали фільтрувальним папером. Тупим скальпелем обережно зішкрябували слизову оболонку товстої кишки. До ізольованої клітинної

маси додавали лізуючий буфер (50 мМ тріс-НСІ, 150 мМ хлорид натрію, 0,1% ДСН, 1% Тритон x100, 1% дезоксихолат натрію та інгібітори протеїназ і фосфатаз (1 мкМ ортованадат натрію)) та гомогенізували на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (ІКА, Німеччина) при швидкості 5 (20500 rpm). Нерозчинні рештки осаджували центрифугуванням при (14000 g, +4°C) впродовж 15 хв. Отриманий тотальний екстракт слизової оболонки товстої кишки щурів переносили в чисті пробірки та занурювали в рідкий азот. Для біохімічного визначення активності каталази, ТБК-активних сполук і тіолових груп зішкрябану слизову оболонку товстої кишки щурів гомогенізували в 0,9% розчині NaCl.

2.3. Визначення вмісту коротколанцюгових жирних кислот у дистальному відділі товстої кишки щурів методом газової хроматографії

Для дослідження брали зразки фекалій щурів масою 1 г та розчиняли в 2 мл 0,02 н HCl. Після додавання кислоти проби гомогенізували, герметично закривали та залишали на 30 хв для екстрагування КЛЖК. Потім зразки центрифугували впродовж 10 хв при 11000 g. Після осадження відбирали 0,3 мл КЛЖК-вмісного супернатанту до якого додавали 0,1 мл 0,05% внутрішнього стандарту (4-метилвалеріанова кислота).

Визначення вмісту КЛЖК проводили на базі Центру колективного користування НАН України при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного з використанням газового хроматографа Agilent 6890N (Agilent Technologies, США) з автосамплером Agilent 7683B (Agilent Technologies, США). Для розділення КЛЖК використовували кварцову капілярну колонку DB_FFAP (Agilent Technologies, США) довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною плівки нерухомої фази 0,25 мкм. В якості рухомої фази був використаний гелій зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Об'єм

інжекції проби складав 1 мкл, температура випаровувача – 250⁰С, поділ потоку в інжекторі – 1:20. Початкова температура термостату становила 100⁰С та витримувалась впродовж 5 хв, тоді піднімалась до 190⁰С зі швидкістю 10⁰С/хв. Загальний час проведення хроматографічного аналізу для кожної проби становив 16 хв. Для детекції КЛЖК в рухомій фазі використовували одноквадрупольний мас-спектрометр Agilent 5973 inert MSD (Agilent Technologies, США). Обробка та інтеграція результатів були проведені за допомогою програмного забезпечення Chem Station Data Analysis D.01.02.16.

Окремі КЛЖК визначали на хроматограмі за часом утримання стандартів оцтової, масляної, ізомасляної, пропіонової, валеріанової, ізовалеріанової та гексанової кислот (“Sigma-Aldrich”, Німеччина) для даних умов хроматографічного розділення. Концентрацію КЛЖК визначали методом нормування площин їх піків щодо площі піку внутрішнього стандарту і виражали у мкмоль/г фекалій. За отриманими результатами у зразках фекалій щурів визначали відносний вміст оцтової (C₂), пропіонової (C₃) і масляної (C₄) кислот $(C_n / \sum(C_2 + C_3 + C_4))$ та анаеробний індекс – відношення суми більш відновлених кислот (пропіонової і масляної) до вмісту оцтової кислоти $(AI = (C_3 + C_4) / C_2)$ [113].

2.4. Визначення загальної концентрації протеїнів у тотальному екстракті клітин слизової оболонки товстої кишки щурів за методом Бредфорда

Для визначення загальної концентрації протеїнів використовували набір Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, США) згідно протоколу виробника. Калібрувальну криву будували на основі екстинкції бичачого сироваткового альбуміну у концентраціях 1,42 мкг/мл; 2,84 мкг/мл; 4,26 мкг/мл; 5,68 мкг/мл; 7,1 мкг/мл; 9,94 мкг/мл; 14,2 мкг/мл. Розведення зразків складало 1:2500.

Рівень екстинкції вимірювали на спектрофотометрі "BioTek Synergy HT" (США) при довжині хвилі 595 нм. Кількість протеїнів у тотальному екстракті слизової оболонки товстої кишки щурів визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

2.5. Вестерн-блот

Об'єм тотального екстракту слизової оболонки товстої кишки щурів, що містить 100 мкг протеїнів, змішували у співвідношенні 1:1 з 2x Laemmli буфером для зразків і нагрівали при температурі 95°C впродовж 5 хв. Розділення білків проводили методом електрофорезу в 12% (для білків: ERK1/2, p38 α/β , FFA2, FFA3) та 8% (Egr-1, Sp-1, HIF1 α) поліакриламідному гелі з ДСН (ДСН-ПААГ) з наступним переносом на нітроцелюлозну мембрану Hybond-ECL, відповідно до стандартного протоколу компанії Bio-Rad. Електрофоретичне розділення білків здійснювали за напруги 150V протягом 60-80 хв, перенос на нітроцелюлозну мембрану – 60V впродовж 3 год з додатковим охолодженням.

Після електропереносу білків мембрану промивали буферним розчином TBST (10 мМ тріс-НСІ, 150 мМ хлорид натрію, 0,05% поліоксиетиленсорбітан монолаурат (Твін-20), рН 7,4) та блокували розчином 1% бичачого сироваткового альбуміну та 1% знежиреного сухого молока в TBST впродовж 1 год. Для визначення окремих білків у слизовій оболонці товстої кишки щурів готували робочі розведення первинних антитіл в TBST (табл. 2.1). Нітроцелюлозну мембрану інкубували у розчині первинних антитіл за кімнатної температури впродовж 1 год при постійному струшуванні. Тоді тричі по 10 хв промивали в буферному розчині TBST та інкубували впродовж 1 год у розчині кон'югованих пероксидазою хрому вторинних антитіл (Santa-Cruz, США), розведених у співвідношенні 1:2500 в

1% розчині знежиреного сухого молока, до імуноглобулінів кроля, миші або кози відповідно до застосовуваних первинних антитіл. Після інкубації мембрани промивали 5 разів по 5 хв у буфері TBST.

Таблиця 2.1.

Загальна характеристика первинних антитіл до білків, проаналізованих методом Вестерн-блот

Білок	Молекулярна маса білка, кДа	Тип первинного антитіла	Виробник антитіл	Робоче розведення антитіл
β-актин	43	Моноклональне миші	Santa-Cruz, США	1:2500
Egr-1	68	Поліклональне кроля	Santa-Cruz, США	1:200
Sp-1	106	Поліклональне кози	Santa-Cruz, США	1:500
HIF1α	93	Моноклональне миші	Novus Biologicals, США	1:500
ERK1	44	Поліклональне кроля	Santa-Cruz, США	1:1000
ERK2	42	Поліклональне кроля	Santa-Cruz, США	1:1000
pERK	42/44	Моноклональне миші	Santa-Cruz, США	1:1000
p38 α/β	38	Поліклональне кроля	Santa-Cruz, США	1:200
p-p38 (Thr180/Tyr182)-R	38	Поліклональне кроля	Santa-Cruz, США	1:200
FFA2	25	Поліклональне кроля	West LA VA Medical Center, США	1:500
FFA3	38	Поліклональне кроля		1:500

Візуалізацію Вестерн-блот проводили ECL-реагентом (H₂O – 9 мл, 1M тріс-НСІ для ECL-реагенту – 10 мл, 68 мМ кумарова кислота – 225 мкл, 1,2 мМ люмінол – 500 мкл). Свічення, яке виникало внаслідок хемілюмінесцентної реакції пероксидази хрому з субстратом, фіксували на

радіографічній плівці (ОНІКО, Україна) з використанням ряду експозицій. Після інкубування плівки у розчинах фіксатора і проявника для рентгенівських плівок (ОНІКО, Україна) одержані зображення сканували за допомогою сканера (Canon PIXMA MP235). Денситометричний аналіз проводили з використанням програмного забезпечення для обробки зображень LI-COR Image Studio Lite Ver 5.2. Молекулярну масу білків визначали за маркером молекулярної маси (CHEMICON International Inc., США). Результати не менше ніж двох різних експериментів були проаналізовані та нормалізовані проти β -актину.

2.6. Визначення показників окисно-антиоксидантного балансу в слизовій оболонці товстої кишки щурів

2.6.1. Визначення каталазної активності

Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2 , незруйнована частина пероксиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс [114].

Для визначення активності каталази у пробірки вносили по 0,5 мл 0,03% розчину пероксиду водню. Реакцію починали, додаючи 0,025 мл гомогенату слизової оболонки товстої кишки щурів. У холосту пробу додавали 0,025 мл дистильованої води. Зразки витримували при кімнатній температурі 10 хв, тоді реакцію зупиняли додаванням 0,25 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі "BіoTek Synergy HT" (США) при довжині хвилі 410 нм.

Каталазну активність розраховували за формулою:

$$E = \left(\frac{A_{хол} - A_{досл}}{a \text{ мг білка} * 22000 * 10} \right) * 10^9 \text{ нмоль } H_2O_2 / \text{хв} * \text{ мг білка},$$

де E – каталазна активність, $A_{\text{хол}}$ і $A_{\text{дос}}$ – екстинція холостої та дослідної проб, K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню, що дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, t – час інкубації 10 хв., a – вміст білка в пробі, мг. Активність визначали у мкмоль H_2O_2 на хвилину на 1 мг білка.

2.6.2. Визначення супероксиддисмутазної активності методом нативного електрофорезу в поліакриламідному гелі

Принцип методу базується на здатності супероксиддисмутази (СОД) конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті фоторедукції рибофлавіну. Супероксидні аніони відновлюють НСТ з утворенням гідразинтетразолію. Оскільки СОД каталізує дисмутацію супероксиду в кисень і перекис водню, на синьому фоні гелю з'являються ахроматичні смуги, які відповідають активності СОД [115].

Об'єм тотального екстракту слизової оболонки товстої кишки щурів, що містить 100 мкг протеїнів, змішували у співвідношенні 1:1 з нативним буфером для зразків (0,125 М тріс-НСІ, 20% гліцерол, 0,04% бромфеноловий синій, рН 6,8). Розділення протеїнів проводили методом електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі, без додавання додецилсульфату натрію. Електрофорез проводили в електродному буфері (H_2O – 1000 мл, тріс– 3,0275 г, гліцин – 14,4 г) при 40 мА з додатковим охолодженням (4°C). Після виходу нижнього фронту з гелю, електрофорез продовжували ще 30-50 хв. Тоді відмивали гель у 10 мл фосфатного буферу (0,05 М KH_2PO_4 , 0,05 М K_2HPO_4 , рН 7,8) впродовж 10 хв та інкубували ще 20 хв у темряві в розчині А (10 мл фосфатного буферу, 8 мкл ТЕМЕД, 28 мкМ рибофлавін, 0,003 г ЕДТА, 2 мг НСТ). Тоді розміщували гель під лампою та витримували до появи прозорих смужок, що репрезентують активність СОД.

2.6.3. Визначення вмісту ТБК-активних сполук

Для визначення вмісту ТБК-активних сполук у дослідні пробірки вносили по 0,15 мл гомогенату слизової оболонки товстої кишки щурів та 1,850 мл тріс-НСІ буферу (25 мМ тріс, 175 мМ КСІ, рН 7,4). В контрольну пробірку вносили 2 мл тріс-НСІ буферу. До проб відразу додавали по 800 мкл 20% трихлороцтової кислоти, денатурований білок осаджували центрифугуванням впродовж 15 хв при 1000 g. До супернатанта (2 мл) додавали 1 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти та інкубували на киплячій водяній бані 15 хв для розвитку забарвлення. Визначення інтенсивності забарвлення проводили на спектрофотометрі при $\lambda = 532$ нм.

Вміст ТБК-активних сполук виражали у нмолях на 1 мг білка розраховували на основі значення молярного коефіцієнта екстинкції комплексу малонового діальдегіду з 2-тіобарбітуровою кислотою: $\varepsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ [116]

2.6.4 Визначення вмісту білкових тіолових груп

Рівень загальних і небілкових тіолових груп визначали колориметрично за реакцією з реактивом Елмана [117].

Для визначення вмісту загальних тіолових груп у пробірки послідовно вносили: 2 мл 30 мМ тріс-НСІ буфера з 1 мМ ЕДТА (рН 8,0); 0,3 мл гомогенату слизової оболонки товстої кишки щурів; 0,2 мл 1,25% ДСН. В контрольну пробу замість гомогенату додавали буферний розчин. Проби залишали на 15 хв при кімнатній температурі, після чого додавали 0,1 мл реактиву Елмана (2,6 мМ дитіонітробензойна кислота в 30 мМ тріс-НСІ буфері з 1 мМ ЕДТА). Через 30 хв вимірювали екстинкцію проб на спектрофотометрі "BioTek Synergy HT" (США) при $\lambda = 412$ нм.

Для визначення вмісту небілкових SH-груп у пробірки послідовно вносили 0,3 мл гомогенату слизової оболонки товстої кишки щурів та 0,1 мл 10,5% трихлороцтової кислоти. Перемішували і залишали на 10 хв при кімнатній температурі, після чого центрифугували 15 хв при 1500 g.

Супернатант переносили в чисті пробірки та нейтралізували 1М NaOH до рН 7,0 (значення рН контролювали за допомогою універсального індикатора). До нейтралізованих проб додавали: 2,1 мл 30 мМ тріс-НСІ буферу з 1 мМ ЕДТА (рН 8,0); 0,1 мл реактиву Елмана. Через 30 хв вимірювали екстинкцію проб на спектрофотометрі "BioTek Synergy HT" (США) при $\lambda = 412$ нм.

Вміст SH-груп розраховували за формулою:

$$\frac{E}{14,15 \cdot a_{\text{мг}}} = \text{мМ SH-груп/мг білка}, \text{ де}$$

E – екстинкція проби

14,15 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ – коефіцієнт молярної екстинкції тіонітрофенільного аніона

a – кількість білку, мг.

Вміст білкових SH-груп розраховували за різницею між показниками вмісту загальних і небілкових SH-груп

2.7. Визначення складу поверхневого слизу кишечника щурів

Поверхневий слиз відділяли від шару епітеліальних клітин за допомогою розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну [118]. По 1 см товстої кишки від анального отвору та тонкої кишки від ілеоцекальної заслінки поміщали в 3 мл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну для кількісного визначення олігосахаридної частини слизу за допомогою Шиф-реакції. Решту товстої і тонкої кишок розрізали і занурювали в пробірки з 9 мл розчину 6 н N-ацетил-1-цистеїну для подальшого визначення вмісту глікопротеїнів, гексоз, фукоз, гексозамінів та сіалових кислот. Кожну пробірку перемішували на вортексі впродовж 4 хв, тоді зразки центрифугували при 3000 g впродовж 15 хв. Відбирали надосад, залишаючи у пробірці осад та надосадову рідину загальним об'ємом 1 мл. Вміст пробірок ресуспендували та гомогенізували

на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (ІКА, Німеччина) при швидкості 5 (20500 rpm) впродовж 20 с.

2.7.1. Визначення глікопротеїнів слизу за методом Шиф-реакції на PVDF-мембрані

Визначення глікопротеїнів поверхневого слизу проводили за допомогою Шиф-реакції на PVDF-мембрані [119]. PVDF-мембрану спочатку занурювали на 2 хв у 100% розчин метанолу, а потім на 2 хв у 80% розчин. Після цього мембрану промивали в дистильованій воді, висушували фільтрувальним папером та поміщали на вологий фільтрувальний папір. На PVDF мембрану наносили 10 мкл гомогенізованого зразку поверхневого слизу та витримували 10-15 хв до повного його поглинання. Мембрану промивали в дистильованій воді впродовж 2 хв, після цього інкубували 10 хв в 0,5% розчині КОН в 70% етанолі та знову промивали в дистильованій воді. Далі мембрану занурювали в 0,5% розчин періодатної кислоти на 10 хв, промивали дистильованою водою і піддавали дії реагенту Шифа впродовж 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 промивання в дистильованій воді мембрану висушували на відкритому повітрі 10 хв та сканували за допомогою сканера (Canon PIXMA MP235). Аналіз зображень проводили вимірюванням щільності позитивно забарвлених точок за допомогою програмного забезпечення для обробки зображень LI-COR Image Studio Lite Ver 5.2.

2.7.2. Визначення загальної концентрації глікопротеїнів слизу

Кількісне визначення загальної концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу товстої і тонкої кишки щурів проводили за реакцією з

реактивом Фоліна після виділення глікопротеїнів слизу сульфосаліциловою кислотою та їх осадження фосфорно-вольфрамовою кислотою [120].

Гомогенат поверхневого слизу тонкої та товстої кишки щурів розводили в 10 разів $H_2O_{\text{дист.}}$. В мікропробірки вносили 500 мкл $H_2O_{\text{дист.}}$, 100 мкл розведеного слизу, 200 мкл 20% сульфосаліцилової кислоти та залишали на 10 хв. Тоді суміш фільтрували через фільтрувальний папір, 300 мкл фільтрату переносили в центрифужні мікропробірки і змішували з 100 мкл 5% фосфорновольфрамової кислоти в 2 н HCl. Через 15 хв зразки центрифугували (7000 g, 15 хв), супернатант зливали. Пробірки з осадом перевертали вверх дном та висушували на фільтрувальному папері. Осад розчиняли в 200 мкл 0,1 н NaOH та додавали 130 мкл 10% NaOH та 50 мкл реактиву Фоліна. Інтенсивність синього забарвлення вимірювали через 10 хв за допомогою спектрофотометра для мікропланшетів "BioTek Synergy HT" (США) при $\lambda=630$ нм. Розрахунок концентрації глікопротеїнів проводили за калібрувальною кривою на основі екстинкції тирозину у концентраціях 500 мкг/мл, 400 мкг/мл, 250 мкг/мл, 200 мкг/мл, 160 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл. Концентрацію глікопротеїнів виражали в мг на 1 мл слизу, який був отриманий в результаті його виділення 6 н N-ацетил-1-цистеїном.

2.7.3. Визначення концентрації гексоз слизу орциновим методом

Принцип методу полягає в тому, що гексози утворюють з орциновим реактивом рожеве забарвлення інтенсивність якого пропорційна вмісту гексоз [121]. Для визначення концентрації гексоз слиз розводили в 10 разів та гідролізували з 4 н HCl (1:1) впродовж 1 год при 100°C. Відбирали 50 мкл гідролізату слизу і змішували з 50 мкл 0,1 н NaOH. До отриманого розчину додавали 850 мкл орцинового реактиву (75 мл реактиву А: 60 мл H_2SO_4 конц., 40 мл H_2O ; 10 мл реактиву Б: 0,16 г орцин, 10 мл H_2O) і нагрівали на водяній бані при 80°C впродовж 15 хв. Інтенсивність фарбування вимірювали за допомогою спектрофотометра для мікропланшетів BioTek SynergyHT"

(США) при довжині світлової хвилі 500 нм. Розрахунок концентрації гексоз проводили за калібрувальною кривою на основі екстинкції занози у концентраціях 8; 5; 4; 2,5; 1; 0,5 мкмоль/мл. концентрацію гексоз виражали в мкмоль на 1 мл слизу, який був отриманий в результаті його виділення 6 н N-ацетил-1-цистеїном.

2.7.4. Визначення концентрації фукози слизу за методом Діше-Шеттлз

Концентрацію фукози визначали за методом Діше-Шеттлз, в основі якого лежить реакція фукози із солянокислим цистеїном [122]. Для визначення концентрації фукози гомогенат поверхневого слизу товстої кишки щурів розводили в 20 разів та гідролізували з 4 н HCl (1:1) впродовж 1 год при 100°C. Відбирали 100 мкл гідролізату слизу та додавали 450 мкл розчину $H_2SO_{4\text{конц}}$ в $H_2O_{\text{дист}}$ (6:1) та інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Потім ставили на 3 хв у киплячу водяну баню, далі – різко охолоджували на льоду. В кожному пробірці вносили 10 мкл 3% солянокислого цистеїну і залишали проби на 1 год при кімнатній температурі в темному місці до появи жовто-зеленого забарвлення. Рівень екстинкції вимірювали на спектрофотометрі "BioTek Synergy HT" (США) при довжинах хвиль 396 нм та 430 нм проти контролю. Різниця між показниками екстинкції при 396 нм та 430 нм відповідала вмісту фукози. Для побудови калібрувальної кривої готували стандартні розведення з вмістом фукози 2,0; 1,6; 1,25; 1, 0,5 мкмоль/мл. Концентрацію фукози виражали в мкмоль на 1 мл слизу, який був отриманий в результаті його виділення 6 н N-ацетил-1-цистеїном.

2.7.5. Визначення концентрації гексозамінів слизу

Концентрацію гексозамінів визначали за реакцією з ацетилацетоном у лужному середовищі [123] після попереднього гідролізу гомогенату поверхневого слизу з 8 н HCl при 100°C впродовж 5 год. Гідролізат слизу

нейтралізували 3 н NaOH до слабко лужної реакції. Відбирали по 100 мкл вмісту нейтралізованого гідролізату слизу та додавали 100 мкл ацетилацетонного реактиву (ацетилацетон – 0,2 мл; 0,5 н Na₂CO₃ – 10 мл). Зразки ставили на киплячу водяну баню на 15 хв. Після охолодження додавали 200 мкл 96% етанолу та 50 мкл реактиву Ерліха (0,08 г п-диметиламінобензальдегід, 3 мл 96 % етанолу, 3 мл HCl_{конц}). Через 30 хв вимірювали екстинцію при $\lambda = 540$ нм за допомогою спектрофотометра для мікропланшетів "BioTek Synergy HT" (США). Результати обраховували за калібрувальною кривою, що була побудована за результатами екстинції стандартних розведень (10, 8, 6, 4, 2, 1 мкмоль/мл) d-глюкозамінгідрохлориду. Концентрацію гексозамінів виражали в мкмоль на 1 мл слизу, який був отриманий в результаті його виділення 6 н N-ацетил-1-цистеїном.

2.7.6. Визначення концентрації сіалових кислот слизу методом Гесса

Концентрацію сіалових кислот визначали за методом Гесса [121] в основі якого лежить реакція взаємодії сіалових кислот з оцтово-сірчаноокислим реактивом після попереднього гідролізу слизу з 0,2 н H₂SO₄ (1:1) при 80°C впродовж 1 год. В мікропробірки зі 100 мкл гідролізату слизу вносили 100 мкл 10% розчину трихлороцтової кислоти. Проби витримували на киплячій водяній бані впродовж 5 хв, після чого охолоджували проточною водою впродовж 5 хв та центрифугували при 7000 g 10 хв. Відбирали по 40 мкл супернатанту та додавали 500 мкл оцтово-сірчаноокислої суміші (5% H₂SO₄ в льодовій оцтовій кислоті). Проби нагрівали на водяній бані при температурі 100°C впродовж 30 хв. Після охолодження інтенсивність фарбування вимірювали за допомогою спектрофотометра "BioTek Synergy HT" (США) при довжині хвилі 546 нм. Концентрацію сіалових кислот в зразках слизу визначали за калібрувальною кривою для N-ацетилнейрамінової кислоти (0,8 мг/мл; 0,6 мг/мл; 0,4 мг/мл; 0,2 мг/мл; 0,1

мг/мл) та виражали в мкмоль на 1 мл слизу, який був отриманий в результаті його виділення б н N-ацетил-1-цистеїном.

2.8. Зимографія

Активність матриксних металопротеїназ (ММП-2 та ММП-9) визначали за допомогою електрофоретичного методу (зимографія), який базується на деградації субстрату (желатину) протеїназами [124]. Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері ((50 мМ тріс-НСІ, 150 мМ хлорид натрію, 0,1% ДСН, 1% тритон x100, 1% дезоксихолат натрію та інгібітори протеїназ і фосфатаз (1 мкМ ортованадат натрію) на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (ІКА, Німеччина). Концентрацію протеїнів вимірювали за методом Бредфорда з використанням набору «Віо–Rad для аналізу білків» (Віо–Rad, США). Зразки готували з використанням 100 мкг заг. протеїну/зразок, до яких додавали нативний буфер для завантаження гелю у співвідношенні 1:1 (x2 – 2,5 мл 0,5 М тріс–НСІ (рН 6,8), 2 мл гліцерола, 4 мл 10% ДСН, 0,5 мл 0,1% бромфенолового синього, 10 мл H₂O_{дист.}) та завантажували в гель без попереднього підігрівання. Протеїни розділяли електрофоретично в 10% поліакриламідному гелі з ДСН та додаванням желатину (10 мг/мл) впродовж 1,5 год (Т=22-23°C, 125V). Відновлення активності ММП в поліакриламідному гелі проводили шляхом видалення з нього ДСН. Для цього гель інкубували в 2,5% розчині тритон x100 при постійному струшуванні впродовж 30 хв при кімнатній температурі (22–23°C). Далі гель інкубували впродовж 16 год (Т=37°C) з буфером для проявки зимограми (x10 – 0,5М тріс–НСІ, 2 М NaCl, 50 мМ CaCl₂ та 0,2% Brij). Потім гель 15 хв забарвлювали 0,5% розчином фарби блакитного кумасі розведеним у розчині метанол – оцтова кислота – вода, змішаних у співвідношенні 50:10:40, та знебарвлювали його у розчині метанолу – оцтової кислоти – води (50:10:40) до появи прозорих смужок (40 хв), що

репрезентують протеолітичну желатиназну активність ММП–2 та ММП–9. Молекулярну масу ферментів визначали за маркером молекулярної маси білків, що завантажували в кожний гель.

2.9. Визначення проникності епітелію товстої кишки щурів

Тваринам щодня впродовж 14 днів внутрішньом'язово вводили цефтриаксон (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна) у дозі 300 мг/кг. Тваринам контрольної групи, відповідно, 0,1 мл води для ін'єкцій. Визначення проникності епітелію товстої кишки щурів проводили на 15 та 72 добу від початку експерименту.

Проникність епітелію товстої кишки визначали з використанням фарби Еванс синій (ЕВ) [125-126]. Щурів анестезували уретаном (1,1 г/кг, внутрішньоочеревинно), проводили лапаротомію, вводили катетер у ворітну вену для забору крові та накладали лігатури на товстий кишечник (біля ілеоцекальної заслінки та анального отвору). В ізольовану ділянку товстої кишки вводили 3 мл 1,5% розчину ЕВ. Через 30, 60 та 90 хв після введення ЕВ у пластикові мікропробірки з гепарином відбирали по 200 мкл крові. Після кожного забору крові вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Кров центрифугували впродовж 5 хв (5,000 g, T= 4°C). Оптичну густину надосадової рідини вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 620 та 740 нм. Вміст ЕВ визначали за формулою: вміст ЕВ в зразку = екстинкція при 620 нм - (1,426 x екстинкція при 740 нм + 0,03). Проникність епітелію товстої кишки щурів визначали за кількістю фарби в крові через 30 та 60 хв після введення в просвіт товстої кишки.

2.10. Моделювання експериментального коліту у щурів

Експериментальний коліт викликали на 72 добу експерименту після попереднього введення цефтриаксону (300 мг/кг, 14 днів) одноразовим ректальним введенням (7 см від анального отвору за допомогою гумового катетеру S8 (Rüsch, Німеччина) 0,1 мл 3% розчину йодоацетаміду розчиненого в 1% розчині метилцелюлози [127]. Щурам контрольної групи вводили 0,1 мл 1% розчину метилцелюлози.

Тварин ($n = 20$) розділили на 4 групи: контроль, яким впродовж 14 діб (1-14 доба) вводили воду для ін'єкцій (внутрішньом'язово) та 1% метилцелюлозу (ректально) на 72 добу експерименту; коліт, яким вводили воду для ін'єкцій (1-14 доба) та 3% йодоацетамід (ректально) на 72 добу експерименту; група, якій вводили цефтриаксон (Цф) в дозі 300 мг/кг (внутрішньом'язово) впродовж 14 діб (1-14 доба) та 1% метилцелюлозу на 72 добу експерименту; Цф + Коліт, якій вводили цефтриаксон в дозі 300 мг/кг (1 – 14 доба) та 3% йодоацетамід на 72 добу експерименту. Щурів умертвляли шляхом інгаляції CO_2 з подальшою цервікальною дислокацією через 6 год після ректального введення йодоацетаміду або метилцелюлози. Методом кардіопунктури відбирали кров для імуноферментного аналізу. Видаляли ділянку товстої кишки довжиною 7 см від анального отвору, розрізали в поздовжньому напрямку, промивали в охолодженому фізіологічному розчині та злегка промокали фільтрувальним папером. Проводили оцінку макроскопічних уражень: площу ураження (мм^2), поперечний переріз стінки товстої кишки (мм), площу ділянки, що втратила складки (мм^2), масу кишки в перерахунку на 100 г маси тварини (мг/100г тіла), набряк товстої кишки за шкалою 0-3 (0 – без змін; 1– м'яке; 2 – помірне, 3 – сильне потовщення), а також загальний ступінь ураження товстої кишки за шкалою 0-3 (0 – норма, 1 – уражено 1-10% товстої кишки, 2 – уражено 11-30%, 3 – уражено більше ніж 30%). Тоді занурювали видалену ділянку товстої кишки в 10% розчин формаліну для подальших гістологічних досліджень.

2.11. Бактеріологічний аналіз мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів

Фекалії щурів (1 г) гомогенізували в 9 мл стерильного 0,5% розчину хлориду натрію. З отриманого гомогенату готували робочі десятикратні розведення (10^{-1} – 10^{-8}). Кількісний та якісний склад мікробіоти визначали посівом робочих розведень на диференційно-діагностичні середовища з селективними властивостями: Bifidobacterium Agar для біфідобактерій; MRS агар для лактобактерій; залізовмісний сульфїтний агар для клостридій; манїт-сольовий агар для виділення бактерій роду *Staphylococcus*, які метаболізують манїт (*Staphylococcus aureus*) та не використовують манїт в якості джерела вуглецю (*Staphylococcus spp.*); цитратний агар Симонса для виділення умовно-патогенних ентеробактерій, які здатні метаболізувати цитрат; 5% кров'яний агар для гемолітичних бактерій. Культивували при температурі 37°C, обрахунок колоній здійснювали через 24-48 год. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними та тинкторіальними властивостями.

Виділення бактерій групи кишкової палички проводили з використанням агару Ендо. Після інкубації при 37°C впродовж 24 годин колонії мікроорганізмів, що метаболізують лактозу (рожевий) та лактозонегативні (безбарвні), пересівали в пробірки на трицукровий залізовмісний агар уколом у стовбчик і штрихом по скошеній поверхні та культивували 48 год за 37°C. Бактерії, що метаболізують лактозу, здатні виділяти газ та не утворюють сірководень, розглядалися як лактозопозитивні *Escherichia coli*, лактозонегативні бактерії, здатні виділяти газ та не утворювати сірководень – як лактозонегативні *Escherichia coli*.

Після ідентифікації проводили кількісний облік мікроорганізмів, які росли у вигляді окремих колоній на диференційно-діагностичних середовищах з врахуванням робочого розведення. Результати представляли у вигляді lg колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г фекалій (lg КУО/г).

2.11.1. Визначення транслокації бактерій в кров

Щурів анестезували уретаном, з розрахунку 1,1 г/кг (внутрішньоочеревинно), в асептичних умовах проводили лапаротомію, вводили стерильний катетер у ворітну вену для забору крові. Відбирали 1 мл крові та готували десятикратні розведення у стерильному фізіологічному розчині. Загальну кількість мікроорганізмів у крові виявляли методом посіву робочих розведень на 5% кров'яний агар. Кількість мікроорганізмів виражали у вигляді lg КУО в 1 мл крові (lg КУО/мл).

2.12. Гістологічний аналіз товстої кишки щурів

2.12.1. Морфометричний аналіз гістологічних зрізів

Ділянки товстої кишки довжиною 1 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 мікроскопі (Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome, США). 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 Model BX41 та фотокамеру Olympus Digital Camera C5050 Zoom (Японія). За допомогою комп'ютерної програми Image J вимірювали:

товщину слизової оболонки (мкм), глибину крипт (мкм), висоту ентероцитів (мкм) та площу поперечного перерізу їх ядер (мкм²).

2.12.2. Цитохімічне визначення келихоподібних і тучних клітин

Ділянки товстої кишки довжиною 1 см, які видаляли на відстані 3 см від анального отвору, фіксували у фіксаторі Карнуа (метанол, хлороформ, льодова оцтова кислота у співвідношенні 6:3:1 відповідно), заливали у парафін, та виготовляли поперечні зрізи товщиною 5 мкм на роторному мікроскопі (Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome, США). Для цитохімічної ідентифікації тучних клітин зрізи товстої кишки забарвлювали толуїдиновим синім (ТОВ "БиоВитрум", Росія), для ідентифікації келихоподібних клітин – альціановим синім (ТОВ "БиоВитрум", Росія). Забарвлення проводили згідно з протоколом виробника. В тучних клітинах підраховували кількість гранул на одну клітину під імерсійним об'єктивом мікроскопа (Olympus System Microscope Model BX41, Японія). Також, підраховували кількість келихоподібних клітин на площу крипти (мм²) та площу поперечного перерізу келихоподібних клітин (мкм²) за допомогою комп'ютерної програми Image J. У кожній експериментальній групі було проаналізовано щонайменше 100 клітин.

2.12.3. Імуногістохімічне дослідження рецепторів і транспортерів КЛЖК

Для імуногістохімічного дослідження рецепторів і транспортерів КЛЖК, 1 см товстої кишки видаляли на відстані 3 см від анального отвору, для фіксації зразків використовували 10% розчин формаліну у фосфатному буферному розчині (рН 7,3-7,4). Заливали у парафін за загальноприйнятою методикою, та виготовляли зрізи товщиною 5 мкм на роторному мікроскопі (Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome, США). Парафінові зрізи переносили на предметні скельця з адгезивною поверхнею (HistoBond[®], Paul

Marienfeld GmbH & Co. KG, Німеччина) та проводили через ксилол та розчини етилового спирту з поступовим зниженням концентрації. Демаскування антигенів здійснювали шляхом нагрівання в цитратному буферному розчині (рН 6,0) на водяній бані (98°C) впродовж 30 хв. Активність ендогенної пероксидази блокували 0,3% розчином пероксиду водню після чого промивали тріс-НСІ буфером (рН 7,6). Зразки інкубували впродовж 30 хв з антитілами кроля (West LA VA Medical Center, США) до FFA2 (розведення 1:300) та FFA3 (1:400) рецепторів КЛЖК, а також МСТ1 (1:400), МСТ4 (1:400) та SMCT1 (1:500) транспортерів КЛЖК. На відмиті зрізи наносили робочий розчин (1:100) вторинних поліклональних антитіл проти IgG кроля мічених пероксидазою хрому (Dako, Данія) у випадку дослідження рецепторів КЛЖК, та мічені флуоресцентно для транспортерів. Інкубували впродовж 30 хв. Фарбування зрізів для визначення рецепторів КЛЖК проводили розчином 3,3-діамінобензидину тетрагідрохлориду (Dako, Данія) і пероксиду водню у тріс-НСІ буфері (рН 7,2) проводили впродовж 5 хв. Після чого скельця із зрізами відмивали дистильованою водою та дофарбовували гематоксиліном Майєра (Dako, Данія). Зрізи для визначення транспортерів КЛЖК дофарбовували барвником Sytox зелений (Thermo Fisher Scientific, США). Після забарвлення зразки зневоднювали та заливали в канадський бальзам.

2.14. Імуноферментний аналіз

Для імуноферментного аналізу кров відбирали методом кардіопунктури, після чого інкубували в термостаті (+37°C) впродовж 30 хв та центрифугували 15 хв при 3500 g. Рівень інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та фактору некрозу пухлин- α (ФНП- α) визначали за допомогою методу «сендвіч»-ELISA (варіанту твердофазного імуноферментного аналізу, enzyme

linked immunosorbent assay), з використанням наборів реагентів для імуноферментного визначення концентрації ІЛ-10 (Вектор-Бест, Росія) та ФНП- α (Вектор-Бест, Росія) в сироватці крові, згідно протоколу виробника. Концентрацію ФНП- α та ІЛ-10 виражали в пг/мл сироватки крові. Всі вимірювання проводили не менше двох разів, результати усереднювали.

2.14. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0. Для оцінки кількісних показників визначали середнє значення (M) та стандартну похибку середнього (m). Для всіх наявних вибірок перевірена гіпотеза нормальності розподілу за методом Шапіро-Уїлка. 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 Стюдента. Критичний рівень вірогідності нульової статистичної гіпотези (p) приймався рівним 0,05.

РОЗДІЛ 3

ВМІСТ КЛЖК ТА РІВЕНЬ КЛЖК-СПЕЦИФІЧНИХ РЕЦЕПТОРІВ І ТРАНСПОРТЕРІВ У ДИСТАЛЬНОМУ ВІДДІЛІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

3.1. Вміст КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону

Відомо, що використання антибіотиків суттєво впливає на стан кишкової мікробіоти [29]. Загальноприйнято вважати, що вплив антибіотиків на мікробіоту організму є тимчасовим і обмежується тривалістю курсу антибіотикотерапії. В останні роки з'являється все більше відомостей, що антибіотикотерапія призводить до незворотних змін у складі нормобіоти людини [14-15, 33] наслідки яких залишаються недостатньо вивченими. Тому актуальним є дослідження складу мікробіоти товстої кишки не тільки під час введення антибіотика, але також у віддалені терміни після його відміни.

Нами встановлено, що введення цефтриаксону впродовж 14 днів призводить до порушень якісного і кількісного складу кишкового мікробіоценозу щурів, які посилюються з часом. Так, на першу добу після відміни цефтриаксону (15 доба) кількість грампозитивних анаеробних цукролітичних біфідобактерій та лактобактерій була близькою до контрольних значень (табл. 3.1). Однак різко зростала кількість умовно-патогенних та гемолітичних бактерій. Серед бактерій роду *Staphylococcus* виявлялась тенденція до зниження *Staphylococcus aureus*, зі збільшенням кількості *Staphylococcus spp.*, які не метаболізують маніт. Лактозопозитивні *Escherichia coli* не висівались одразу після введення цефтриаксону (15 доба), однак на 29 добу експерименту їх кількість відповідала контрольним значенням.

Таблиця 3.1

Кількість основних груп мікроорганізмів кишкового мікробіоценозу щурів
(lg КУО/г фекалій) у різні терміни після введення цефтриаксону
(300 мг/кг, в.м., 14 діб)

Група мікроорганізмів	Перед введенням цефтриаксону (n = 5)	Цефтриаксон, доба експерименту		
		15 доба (n = 5)	29 доба (n = 5)	72 доба (n = 5)
Біфідобактерії	8,86 ± 0,24	8,77 ± 0,24	8,13 ± 0,22	8,80 ± 0,15
Лактобактерії	8,79 ± 0,16	8,18 ± 0,48	8,76 ± 0,06	9,00 ± 0,21
<i>Clostridium spp.</i>	1,94 ± 0,06	1,74 ± 0,19	2,20 ± 0,20	3,18 ± 0,48*
<i>Escherichia coli</i> лактозопозитивні	5,21 ± 0,27	0,00 ± 0,00*	5,14 ± 0,92	7,04 ± 0,51*
<i>Escherichia coli</i> лактозонегативні	1,72 ± 0,85	2,22 ± 0,92	2,50 ± 1,40	4,12 ± 0,78*
Умовно-патогенні ентеробактерії	1,08 ± 0,44	4,10 ± 0,13*	3,96 ± 0,01*	6,02 ± 0,68*
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,41 ± 0,07	3,95 ± 0,67*	4,42 ± 0,24	6,57 ± 0,48
<i>Staphylococcus spp.</i>	1,02 ± 0,08	4,68 ± 0,58*	2,40 ± 0,98	6,69 ± 0,26*
Гемолітичні бактерії	4,23 ± 0,23	7,63 ± 0,55*	5,06 ± 0,42	6,34 ± 0,48*

Примітка. * – $p \leq 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

На 72 добу (через 56 днів після відміни цефтриаксону) різко зростає кількість як лактозопозитивних, так і лактозонегативних *E. coli*, умовно-патогенних ентеробактерій та бактерій роду *Clostridium spp.*

Отже, введення цефтриаксону не змінює кількість облигатних анаеробних представників кишкової мікробіоти щурів, біфідобактерій та лактобактерій, проте призводить до стійкого в часі збільшення умовно-патогенних та гемолітичних бактерій. На 72 добу (через 56 днів після

відміни цефтриаксону) кількість *E. coli*, бактерій роду *Clostridium* суттєво перевищує контрольні значення.

В останні роки набуває актуальності вивчення процесів обміну низькомолекулярними метаболітами між мікробіотою і макроорганізмами [128-130]. Одними з найважливіших метаболітів кишкової мікробіоти, що мають суттєвий фізіологічний ефект, є КЛЖК. Тому наступним етапом нашої роботи було визначити вміст КЛЖК дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни після 14 добового введення цефтриаксону.

Харчові волокна є потенційним субстратом для синтезу КЛЖК мікробіотою товстої кишки. Оскільки у гризунів сліпа кишка є основним органом, де рослинна їжа затримується та ферментується мікроорганізмами [131], ми з'ясували, як змінюється маса даного органу після введення цефтриаксону (рис. 3.1). Так, на 15 добу експерименту маса сліпої кишки була збільшеною в 2,9 раза ($p < 0,01$), на 29 добу – в 1,5 раза ($p < 0,01$), а на 72 добу – в 1,3 раза ($p < 0,01$) порівняно із контрольними значеннями.

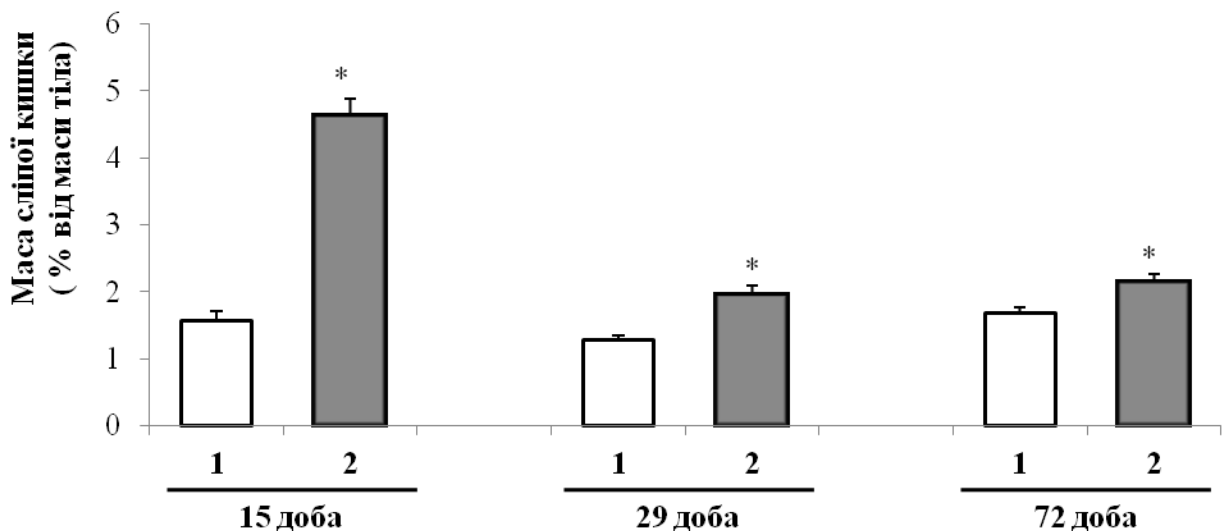


Рис. 3.1. Маса сліпої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 18$), 2 – цефтриаксон ($n = 18$); * – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Далі ми визначили, як змінюється вміст КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів після введення цефтриаксону. На 15 добу експерименту загальний вміст КЛЖК ($\Sigma(C2-C6)$) при введенні цефтриаксону був зниженим в 4,8 раза ($p < 0,05$) порівняно з контролем (табл. 3.2). Вміст оцтової, пропіонової та масляної кислот був зниженим в 2,9; 13,8 і 8,5 раза ($p < 0,05$), відповідно. Вміст валеріанової, ізовалеріанової і капронової кислоти був нижче рівня детекції за даних параметрів хроматографічного розділення.

Таблиця 3.2

Вміст коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) у дистальному відділі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб)

КЛЖК	Вміст (мкмоль/гфекалій)		
	Контроль (n = 4)	Цефтриаксон, доба експерименту	
		15 доба (n = 4)	72 доба (n = 4)
Оцтова	10,98 ± 1,82	3,79 ± 1,03*	8,27 ± 0,66#
Пропіонова	7,32 ± 1,41	0,53 ± 0,19*	2,41 ± 0,15*#
Масляна	3,75 ± 0,72	0,44 ± 0,14*	3,91 ± 0,15#
Валеріанова	0,37 ± 0,11	-	0,27 ± 0,03
Ізовалеріанова	0,32 ± 0,13	-	0,38 ± 0,02
Капронова	0,45 ± 0,13	-	0,17 ± 0,09
Загальний вміст КЛЖК	22,65 ± 3,47	4,75 ± 1,36*	15,14 ± 0,95#

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі; # – $p < 0,05$ відносно значень, отриманих на 15 добу; “-” вміст кислоти нижче рівня детекції за даних параметрів хроматографічного розділення.

Серед КЛЖК найбільше значення мають оцтова, масляна та пропіонова кислоти, які є кінцевими продуктами метаболізму цукролітичної і протеолітичної мікробіоти кишки та використовуються для інтегральної оцінки її стану [132]. Після введення цефтриаксону на 15 добу експерименту ми відмічали збільшення відносного вмісту оцтової кислоти в 1,6 раза та зниження частки пропіонової і масляної кислот у 3,3 та 1,9 раза ($p < 0,05$), відповідно (рис. 3.2). Ці зміни підтверджувались зниженням в 4,3 раза ($p < 0,05$) анаеробного індексу (рис. 3.3), який відображає окисно-відновний потенціал середовища товстої кишки.

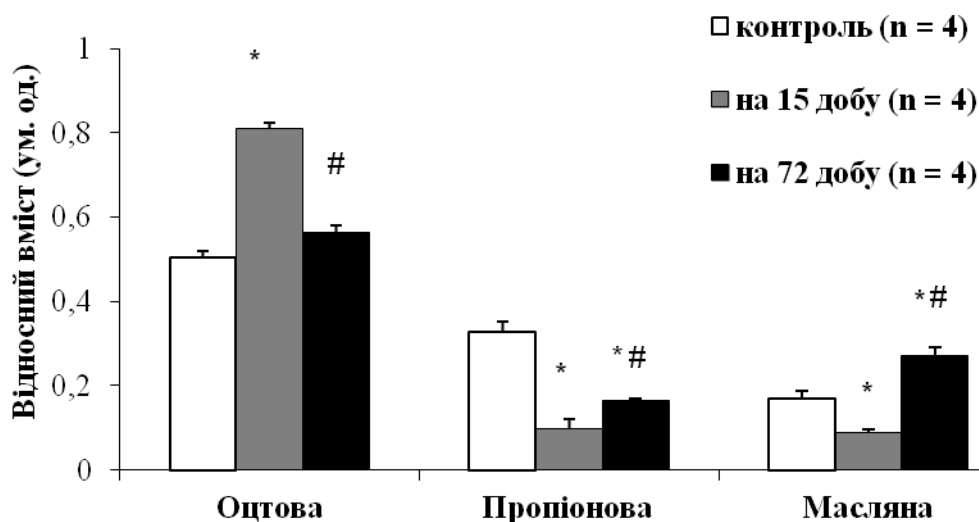


Рис. 3.2. Відносний вміст оцтової, пропіонової та масляної кислот у дистальному відділі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); $M \pm m$; $n = 12$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі; # – $p < 0,05$ відносно значень, отриманих на 15 добу.

Враховуючи, що дисбіотичні порушення кишкової мікробіоти щурів спостерігаються впродовж тривалого часу після припинення введення антибіотика, ми перевірили, як ці зміни впливають на вміст КЛЖК. На 72 добу загальний вміст КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів

підвищувався достовірно по відношенню до значень, отриманих на першу добу після введення цефтриаксону (15 доба експерименту). Проте вміст пропіонової кислоти залишався зниженим у 3 рази ($p < 0,05$) відносно контролю. Вміст масляної кислоти у дистальному відділі товстої кишки щурів, яким вводили цефтриаксон, відповідав контрольним значенням на 72 добу (табл. 3.2).

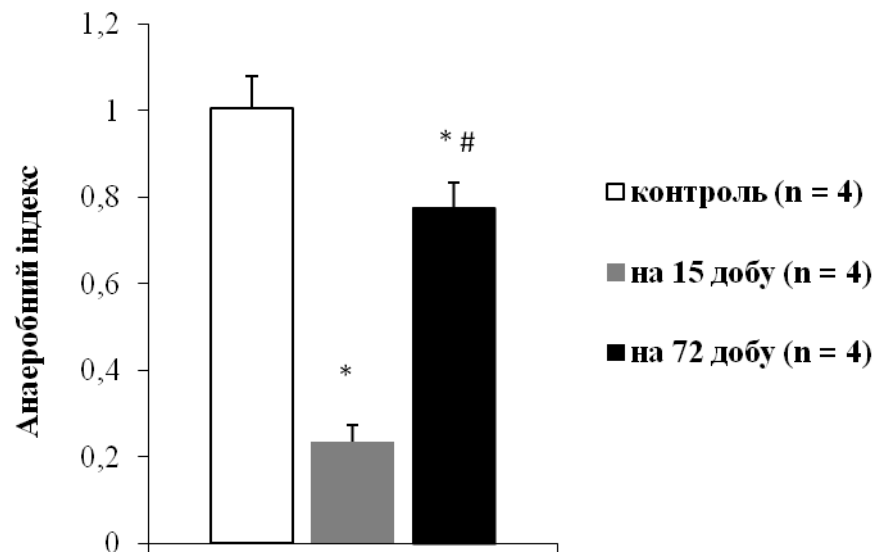


Рис. 3.3. Анаеробний індекс у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); $M \pm m$; $n = 12$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі; # – $p < 0,05$ відносно значень, отриманих на 15 добу.

Відносний вміст оцтової кислоти знижувався в 1,5 рази ($p < 0,05$) на 72 добу порівняно зі значеннями, отриманими на 15 добу, та відповідав контрольним значенням, в той час як відносний вміст пропіонової кислоти залишався зниженим в 2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем (рис. 3.2). Відносний вміст масляної кислоти, навпаки, в 1,6 рази ($p < 0,05$) перевищував контрольні значення. Анаеробний індекс в 1,3 рази ($p < 0,05$) був нижчим контрольних значень на 72 добу експерименту (рис. 3.3).

Таким чином, отримані результати вказують на те, що введення цефтриаксону призводить до різкого зниження загального вмісту КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів відразу після введення антибіотика. Найбільш суттєвими спостерігаються зміни вмісту пропіонової і масляної кислот, що призводить до зростання відносного вмісту оцтової кислоти. Ці зміни є стійкими в часі. Навіть на 72 добу суттєво зниженим залишається вміст пропіонової кислоти та анаеробний індекс. Отже, антибіотикотерапія призводить до стійких тривалих порушень метаболічної активності мікробіоти товстої кишки щурів.

Зниження вмісту КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки є очікуваним після прийому антибіотиків. Вплив антибіотикотерапії на продукцію КЛЖК мікробіотою товстої кишки розглядався раніше [25-28]. Пероральний прийом кліндаміцину здоровими волонтерами впродовж 6 днів призводив до зниження загального вмісту КЛЖК у фекаліях у 8,6 раза та збільшення відносного вмісту оцтової кислоти з 50% до 90% від загального вмісту [26]. Клінічні дослідження також показали суттєве зниження загального вмісту фекальних КЛЖК під час антибіотокоасоційованої діареї, незалежно від групи антибіотиків (цефуроксим, ципрофлоксацин, кліндаміцин, доксициклін, метронідазол, пеніцилін, тетрациклін, ванкоміцин та ін.) [27]. Внутрішньом'язове введення здоровим волонтерам 1 г цефтриаксону впродовж 5 днів призводило до суттєвого зниження вмісту КЛЖК у фекаліях на третій і п'ятий день терапії [133].

Оскільки більшість досліджень проводилось під час або одразу після введення антибіотика, залишається відкритим питання щодо тривалості порушень метаболічного профілю мікробіоти, обумовлених антибіотикотерапією. У нашому дослідженні ми спостерігали стійкі в часі зміни вмісту КЛЖК, які не супроводжувались суттєвим зниженням кількості анаеробних мікроорганізмів, що є основними продуцентами КЛЖК. Отже, виявлені зміни вмісту КЛЖК є перш за все свідченням порушення метаболічної активності кишкової мікробіоти після антибіотикотерапії, а не її

складу. Це дозволяє припустити, що збільшення маси сліпої кишки пов'язане з накопиченням речовин, які повинні розщеплюватись мікроорганізмами. Tulstrup і ін. [134] показали збільшення ваги сліпої кишки після введення амоксициліну і ванкомицину. Розвиток розширеної сліпої кишки є характерною рисою в гризунів-гнотобіонтів [135].

З огляду на те, що КЛЖК є основним енергетичним субстратом для ентероцитів [20], зниження їх вмісту може призводити до порушення гомеостазу клітин слизової оболонки товстої кишки щурів. Встановлено, що порушення біохімічного взаємозв'язку між мікробіотою та макроорганізмом впливає на перебіг запалення на моделях коліту, артриту і астми [53]. Зменшення кількості бутират-продукуючих бактерій та вмісту КЛЖК виявлено у фекаліях хворих на виразковий коліт, що вказує на роль дисбактеріозу кишечника і зменшення бутирату в розвитку даної патології [136]. Подібні зміни також відмічались при нозокоміальних діареях та *S. difficile*-асоційованому коліті [137]. Зниження фекального бутирату було виявлено у пацієнтів з аденокарциномою товстої кишки [138].

Виявлене нами зниження анаеробного індексу та збільшення відносного вмісту оцтової кислоти може свідчити про пригнічення активності анаеробної та активацію аеробної ланки мікробіоти у відповідь на введення цефтриаксону. Пропіонат і бутират мають однаковий прозапальний потенціал, обумовлений пригніченням транскрипції ядерного фактора каппа-В, в той час як ацетат виявляє значно меншу ефективність [51]. Крім того, бутират і пропіонат, але не ацетат, впливають на секрецію кишкових гормонів, що є важливим механізмом регуляції метаболізму макроорганізму мікробіотою [139]. Ацетат може збільшувати ацетилювання гістонів клітин макрофагів *in vitro* шляхом ретроінгібування гістондеацетилаз та активації гістонацетилтрансферази. Це призводить до активації транскрипції прозапальних генів та синтезу цитокінів [140]. Тому отримані нами дані вказують на прозапальні властивості внутрішньопорожнинного середовища товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.

3.2. Вплив цефтриаксону на імуногістохімічну реактивність транспортерів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів

Ми припустили, що обумовлені введенням цефтриаксону дисбіотичні зміни мікробіоти товстої кишки та вмісту КЛЖК призводитимуть до змін у транспортно-рецепторній системі, яка опосередковує ефект даних кислот на організм. На сьогодні відомо, що всмоктування КЛЖК клітинами епітелію товстої кишки здійснюється за участю білків-переносників [141].

За умов норми (контрольна група щурів) позитивне імуногістохімічне забарвлення протон-залежних транспортерів коротколанцюгових монокарбонових кислот (MCT1 та MCT4) детектувалось на базолатеральній мембрані поверхневих та ентероцитів крипт товстої кишки щурів (рис. 3.4). Зокрема, MCT4 транспортер був виявлений на базолатеральній мембрані поверхневих епітеліальних клітин, та ентероцитів, що вистилають верхню половину крипт, у той час як MCT1 транспортер локалізувався на базолатеральній мембрані поверхневих ентероцитів та епітеліальних клітин по всій довжині крипт. Інтенсивність імуногістохімічного фарбування MCT1 та MCT4 транспортерів збільшувалась після введення цефтриаксону.

Імунореактивність для Na^+ -залежного транспортера коротколанцюгових монокарбонових кислот 1 (SMCT1) була локалізована на апікальній мембрані поверхневих, та ентероцитів по всій довжині крипт (рис. 3.4). Імунореактивність SMCT1 транспортерів була нижчою в слизовій оболонці товстої кишки щурів, яким вводили цефтриаксон порівняно з контрольною групою.

Отже, введення цефтриаксону приводить до підвищення імунореактивності протон-залежних MCT1 та MCT4 транспортерів коротколанцюгових монокарбонових кислот на базальній мембрані ентероцитів, проте знижує імунореактивність апікального Na^+ -залежного

SMCT1 транспортера коротколанцюгових монокарбонових кислот у слизовій оболонці товстої кишки щурів.

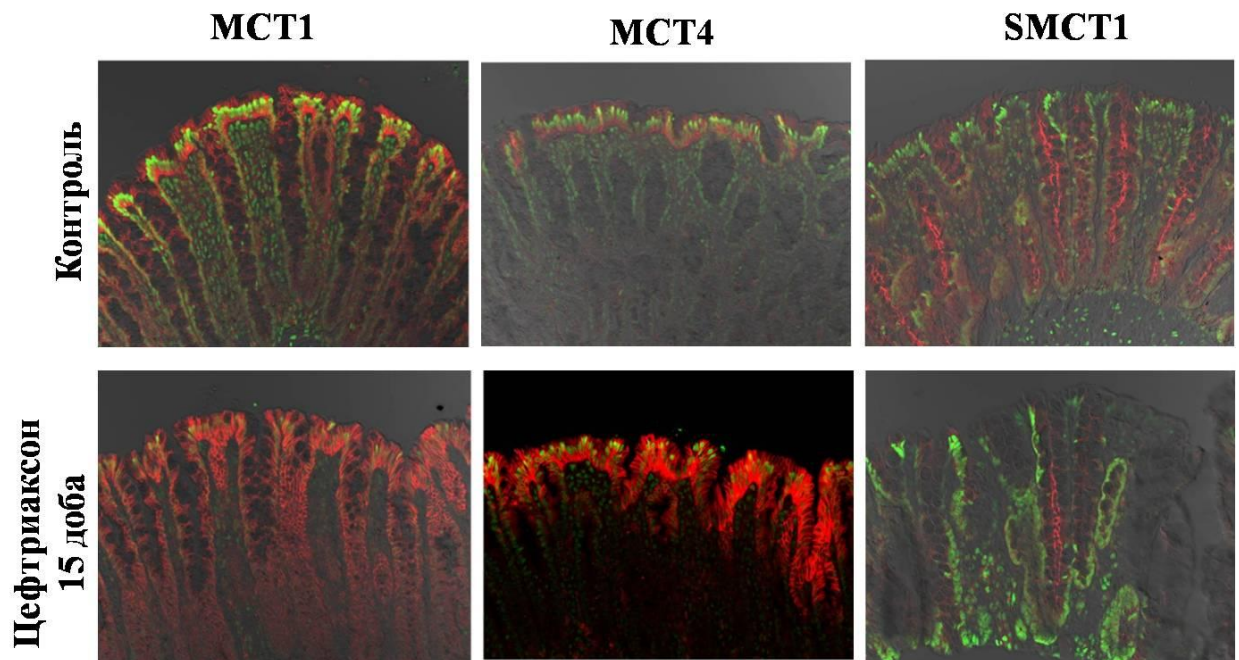


Рис. 3.4. Імунореактивність MCT1, MCT4 і SMCT1 транспортерів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): імуногістохімія (позитивне забарвлення – червоний колір), $\times 400$; $n = 6$.

Всмоктування КЛЖК у товстій кишці є дуже ефективним процесом, оскільки тільки 5-10% КЛЖК виводиться з організму у складі фекалій [16]. КЛЖК можуть транспортуватись у клітини за допомогою пасивної дифузії та за участю SMCT і MCT мембранних транспортерів [141-142]. Однак, за фізіологічних значень рН вмісту товстої кишки (5,6-6,6), КЛЖК перебувають в аніонній формі, і тому не можуть транспортуватися шляхом простої дифузії [143]. Таким чином, очевидно, що в природних умовах КЛЖК переважно транспортуються за участю транспортерів. Результати нашого дослідження виявили локалізацію MCT1 та MCT4 транспортерів на базолатеральній мембрані ентероцитів, у той час як SMCT1 – на апікальній мембрані

епітеліальних клітин дистального відділу товстої кишки щурів, що узгоджується з дослідженнями інших авторів [144]. Це дозволяє припустити, що SMCT1 транспортери беруть участь у всмоктуванні КЛЖК з просвіту товстої кишки, тоді як MCT транспортують КЛЖК у системний кровотік. Введення цефтриаксону збільшувало імунореактивність MCT транспортерів на мембранах клітин слизової оболонки товстої кишки щурів, що може свідчити про збільшення надходження КЛЖК в кровотік.

Ми виявили, що імунореактивність SMCT1 суттєво знижувалась після введення цефтриаксону. Cresci та ін. [145] показали, що експресія SMCT1 знижується на 75% в товстій кишці ($P < 0,0001$) і 85% в тонкій кишці ($P < 0,0001$) у мишей-гнотобіонтів. Експресія транспортера відновлюється після колонізації мишей-гнотобіонтів бактеріями. Крім того SMCT1 не експресуються у пацієнтів з раком товстої кишки, на моделі раку кишечника мишей, а також в клітинних лініях раку товстої кишки [20]. Відновлення експресії SMCT1 у ракових клітинах товстої кишки викликає апоптоз цих клітин, але тільки за наявності в зовнішньому середовищі масляної кислоти. Таким чином, SMCT1 опосередковує онкосупресорний ефект масляної кислоти.

Також відомо, що SMCT1 здійснює транспорт КЛЖК шляхом симпорту з Na^+ . Процес перенесення електрогенний, оскільки відношення Na^+ / монокарбоксилат за транспортний цикл складає ≥ 2 [146-147]. Ці дані свідчать про зв'язок всмоктування КЛЖК з транспортом води та електролітів в товстій кишці. Наші результати дозволяють припустити, що зниження рівня SMCT1 після антибіотикотерапії може залучатись в механізми розвитку антибіотикоасоційованої діареї.

3.3. Локалізація та рівень FFA2 та FFA3 рецепторів до КЛЖК в товстій кишці щурів після введення цефтриаксону

Відомо, що КЛЖК – це не лише важливе джерело енергії, але також відіграють роль важливих хімічних месенджерів або сигнальних молекул [141]. У 2003 році трьома незалежними групами науковців була показана наявність двох типів рецепторів до КЛЖК: FFA2 (GPR 43) та FFA3 (GPR41) [17-19].

Проведене нами імуногістохімічне дослідження показало, що FFA2 рецептори вільних жирних кислот локалізуються на келихоподібних клітинах по всій довжині крипти слизової оболонки товстої кишки щурів, а також, дещо в меншій мірі порівняно з FFA3, на поверхневих ентероцитах. Після введення цефтриаксону імунореактивність FFA2 помітно знижувалась (рис. 3.5).

FFA3 рецептори переважно локалізувались на мембрані поверхневих ентероцитів слизової оболонки товстої кишки щурів, а також позитивне фарбування детектувалось на келихоподібних клітинах (рис. 3.5). Після введення цефтриаксону інтенсивність імуногістохімічного фарбування FFA3 рецепторів до КЛЖК знижувалась. Крім того, ми виявили локалізацію FFA3 рецепторів до КЛЖК на нейронах ентеральних плевтів товстої кишки (рис. 3.5). Після 14-добового введення цефтриаксону також відмічалось зниження імунореактивності FFA3 рецепторів на нейронах мієнтеральних плевтів.

Отже, отримані результати вказують на зниження імунореактивності FFA2 та FFA3 рецепторів КЛЖК в товстій кишці щурів після введення цефтриаксону. Для кількісної оцінки виявлених змін, а також встановлення їх тривалості, ми визначили рівень FFA2 та FFA3 рецепторів КЛЖК у товстій кишці щурів у різні терміни після введення цефтриаксону методом Вестерн-блот.

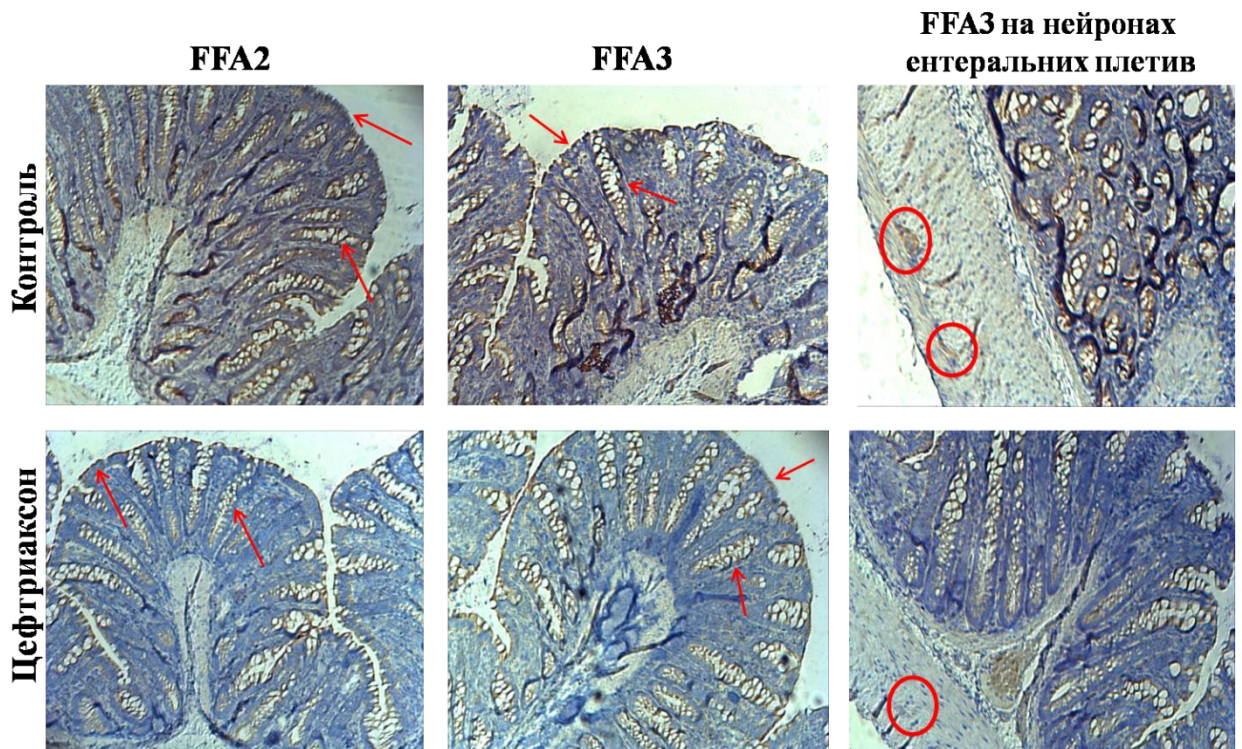


Рис. 3.5. Імунореактивність FFA2 і FFA3 рецепторів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): імуногістохімія (позитивне забарвлення – коричневий колір), $\times 100$, стрілками вказано локалізацію позитивного фарбування; $n = 6$.

Після 14-добового введення цефтриаксону FFA2 рецептори практично не детектувались у слизовій оболонці товстої кишки щурів на 15 та 72 добу експерименту (рис. 3.6А). Рівень FFA3 рецепторів після введення цефтриаксону знижувався в 9,3 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями на 15 добу експерименту. На 29 добу спостерігалось підвищення рівня FFA3 рецепторів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів, яким вводили цефтриаксон, однак значення не були статистично вірогідними. На 72 добу експерименту рівень FFA3 рецепторів збільшувався в 13 разів ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями, отриманими на першу добу після введення цефтриаксону (15 доба експерименту) та статистично вірогідно не відрізнявся від контрольних значень.

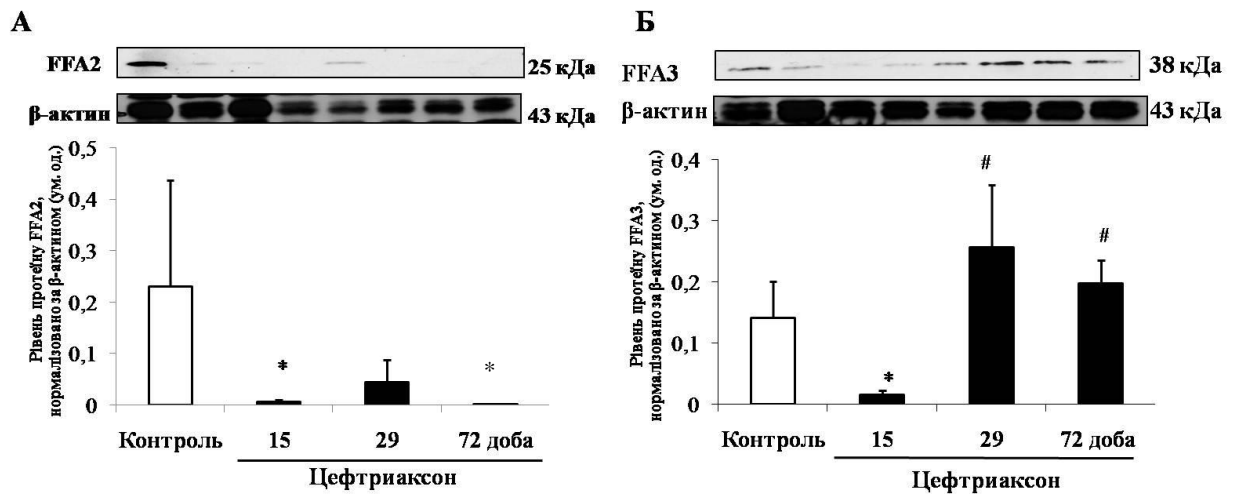


Рис. 3.6. Рівні FFA2 (А) та FFA3 (Б) рецепторів КЛЖК у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після 14-добового введення антибіотика цефтриаксону (300 мг/кг, в.м.): Вестерн-блот аналіз; $M \pm m$; $n = 16$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі; # – $p < 0,05$ відносно показників, отриманих на 15 добу.

Отже, наше дослідження показало зниження імунореактивності та рівня FFA2 та FFA3 рецепторів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.

Зниження або навіть повна втрата імунореактивності FFA2 була виявлена в тканині колоректальної аденокарциноми. Відновлення експресії FFA2 в HCT8 клітинах аденокарциноми людини індукувало G0/G1 арест клітинного циклу та активацію каспаз, що збільшує апоптоз клітин в середовищі, що містить пропіонат/бутират [148]. Селективна експресія FFA2 виявлена в лейкоцитах, зокрема поліморфоядерних клітинах. Також показано, що рецептори КЛЖК виконують важливу роль у рекрутингу нейтрофілів під час запалення в кишечнику та опосередковують регуляцію запальних реакцій кишковою мікробіотою [18]. Активація FFA2 (GPR43) рецепторів КЛЖК на імунних клітинах необхідна для нормального перебігу запальних реакцій. Миші з нокаутіваним геном GPR43 ($Gpr43^{-/-}$) показали

підвищену активність та тривалість запалення на моделях коліту, артриту і астми. Це було пов'язано зі збільшенням продукції запальних медіаторів $Gpr43^{-/-}$ клітинами імунної системи, та підвищеним рекрутингом імунних клітин. Подібні порушення регуляції імунних реакцій також виявлялись у мишей-гнотобіонтів [53].

FFA3 рецептори активно експресуються в клітинах слизової оболонки товстої кишки, та функціонують в якості сенсорів КЛЖК просвіту кишечника [149]. Відомо, що FFA3 рецептори експресуються ентероендокринними клітинами (L-клітини) товстої кишки, що секретують пептид тирозин-тирозин (PYY) та глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) [73, 149]. Tolhurst та ін. [74] показав, що КЛЖК активують секрецію GLP-1 клітинами кишечника *in vitro*. У нокаутованих по $Gpr41^{-/-}$ (FFA3) мишей, секреція GLP-1 була нижчою, ніж у мишей дикого типу. Це свідчить про важливу роль КЛЖК в підтриманні енергетичного гомеостазу організму.

В наших дослідженнях FFA3 рецептори також було виявлено на клітинах мієнтеральних нервових плетив підслизової оболонки, що узгоджується з даними Nøhr та ін. [73]. Показано, що КЛЖК і кетонів тіла регулюють активність симпатичної нервової системи через GPR41(FFA3). Пропіонат підвищує активність симпатичної нервової системи, з іншого боку, кетонів тіла пригнічують за рахунок антагонізму GPR41, що корелювало з ефектами цих речовин щодо споживання енергії [150]. Ці дані свідчать про участь FFA3 рецепторів нервових клітин в регуляції метаболізму організму.

Отже, виявлені зміни рівня рецепторів і транспортерів КЛЖК після введення цефтриаксону підтверджують важливу роль останніх у підтриманні гомеостазу ШКТ та організму в цілому.

Висновки до розділу

1. Введення цефтриаксону впродовж 14 діб не викликало достовірних змін кількості біфідобактерій та лактобактерій, однак призводило до збільшення кількості умовно-патогенних та гемолітичних бактерій серед кишкової мікробіоти щурів на 15 добу. Ці зміни виявлялись на 72 добу експерименту та супроводжувались збільшенням кількості лактозопозитивної і лактозонегативної *Escherichia coli* та бактерій роду *Clostridium* порівняно з контрольними значеннями.

2. Введення цефтриаксону призводило до різкого зниження загального вмісту КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів на 15 добу. Найбільш суттєвими були зміни вмісту пропіонової і масляної кислот, що призводило до зростання відносного вмісту оцтової кислоти. Ці зміни були стійкими в часі та супроводжувались збільшенням маси сліпої кишки щурів через накопичення неперетравлених речовин. Навіть на 72 добу вірогідно зниженим, відносно контрольних значень, залишався вміст пропіонової кислоти та анаеробний індекс.

3. Зниження вмісту КЛЖК після введення цефтриаксону асоціювалось зі змінами рівнів КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів, які опосередковують ефект даних кислот на організм. На 15 добу знижувалась імунореактивність SMCT1 транспортерів КЛЖК на апікальній мембрані ентероцитів слизової оболонки товстої кишки щурів, в той час як імунореактивність MCT1 та MCT4 транспортерів КЛЖК на базальній мембрані ентероцитів підвищувалась.

4. Показано локалізацію FFA2 та FFA3 рецепторів до КЛЖК на мембрані келихоподібних клітин та поверхневих ентероцитів слизової оболонки товстої кишки. Введення цефтриаксону призводило до значного зниження рівня FFA2 та FFA3 рецепторів.

РОЗДІЛ 4

ХАРАКТЕРИСТИКА БАР'ЄРНОЇ ФУНКЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

4.1 Окисно-антиоксидантна рівновага в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону

4.1.1. Активність процесів перекисного окиснення ліпідів та ферментів антиоксидантного захисту в слизовій оболонці товстої кишки щурів

Оскільки КЛЖК виконують важливу роль в енергозабезпеченні ентероцитів та беруть участь у підтриманні функцій кишкового бар'єру [47], ми припустили, що зниження метаболічної активності кишкової мікробіоти внаслідок антибіотикотерапії може призводити до порушень окисно-антиоксидантного балансу в клітинах слизової оболонки товстої кишки. Вміст ШКТ, а також патогенні мікроорганізми здатні здійснювати прозапальний вплив на епітелій, активуючи поліморфоядерні лейкоцити і макрофаги, які є джерелом прозапальних цитокінів та інших медіаторів, з подальшим розвитком оксидативного стресу [100]. Тому наступним завданням нашого дослідження було визначення активності процесів перекисного окиснення ліпідів та ферментів антиоксидантного захисту в різні терміни після введення цефтриаксону.

Введення цефтриаксону призводило до підвищення вмісту ТБК-активних сполук в слизовій оболонці товстої кишки щурів у 4,1 раза ($p < 0,05$), порівняно з контролем, на 15 добу експерименту (рис. 4.1). На 29 добу вміст ТБК-активних сполук перевищував контрольні значення в 2,9 раза ($p < 0,05$) і лише на 72 добу знижувався до контрольних показників.

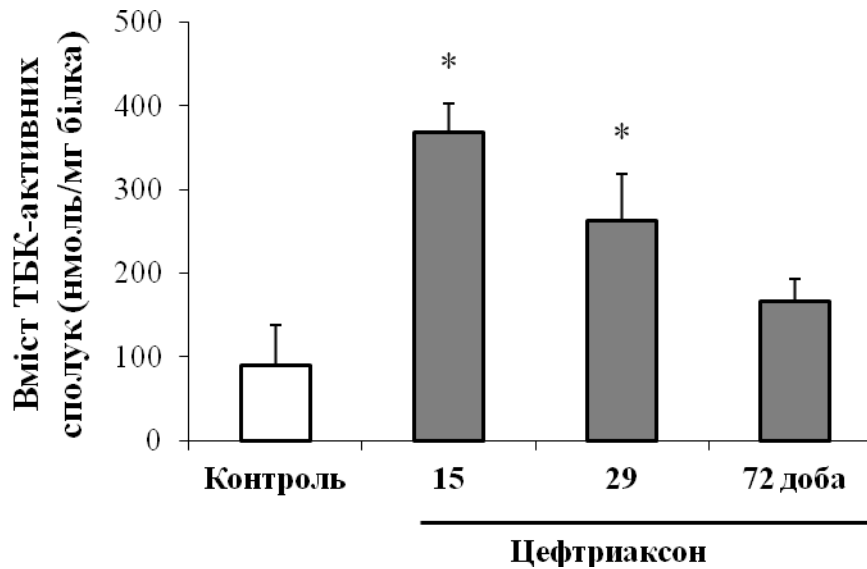


Рис. 4.1. Вміст ТБК-активних сполук у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м., 14 діб); $M \pm m$; контроль ($n = 15$), цефтриаксон ($n = 15$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Супероксиддисмутаза (СОД) є першою лінією захисту від активних форм кисню в клітині каталізуючи реакцію дисмутації супероксидних радикалів $O_2^{\cdot -}$ в O_2 та H_2O_2 . Введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводило до зниження супероксиддисмутазної активності в слизовій оболонці товстої кишки щурів в 1,8 раза ($p = 0,08$) порівняно з контрольними значеннями на 15 добу експерименту (рис. 4.2). СОД активність залишалася зниженою в 1,9 раза ($p < 0,05$) навіть на 72 добу експерименту (через 56 діб після відміни антибіотика).

Каталазна активність в слизовій оболонці товстої кишки після введення цефтриаксону знижувалась в 1,4 раза ($p < 0,05$) на 15 добу експерименту, однак на 29 добу – відмічалось збільшення її активності (рис. 4.3). На 72 добу каталазна активність в слизовій оболонці товстої кишки щурів в 1,4 раза ($p < 0,05$) перевищувала контрольні значення.

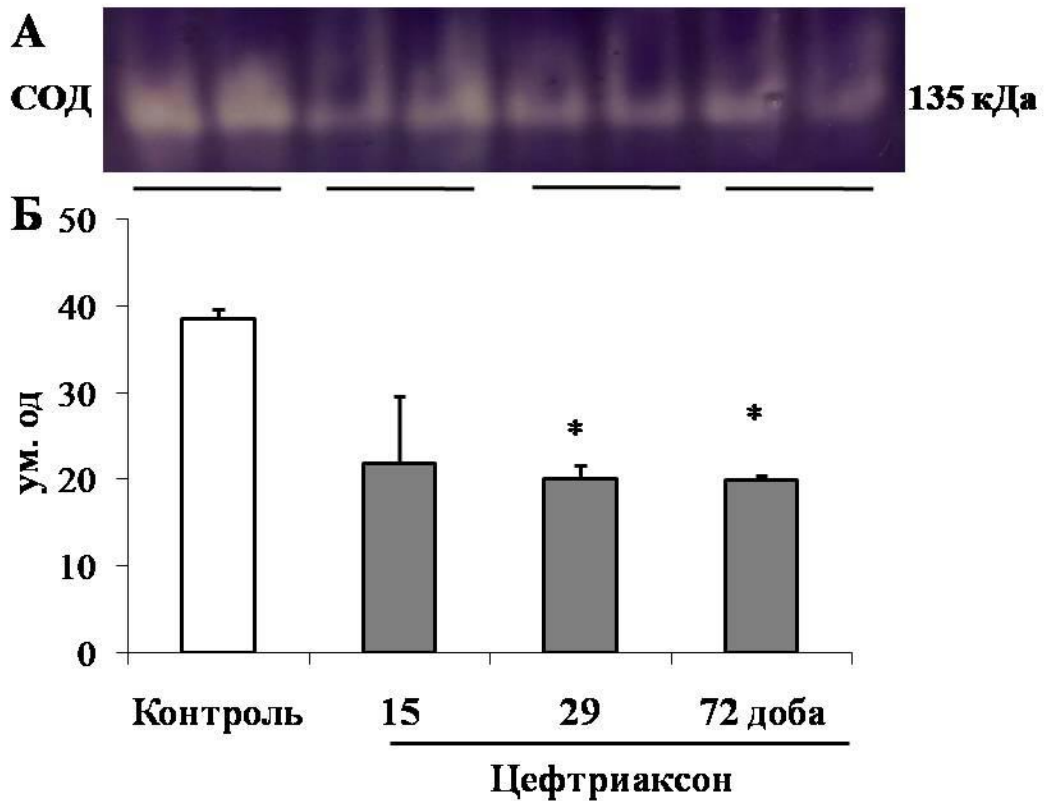


Рис. 4.2. Супероксиддисмутазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); А – електрофореграма після детекції СОД активності, Б – результати денситометрії; контроль (n = 4), цефтриаксон (n = 12); $M \pm m$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Отже, введення цефтриаксону призводить до порушення окисно-антиоксидатного балансу в слизовій оболонці товстої кишки щурів, яке спостерігається впродовж тривалого часу після відміни антибіотика.

Активні форми кисню та оксиду нітрогену постійно утворюються в ШКТ [100]. Наслідком неконтрольованого оксидативного стресу може бути активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), маркером інтенсивності якого є накопичення ТБК-активних сполук, що утворюються в результаті перекисного окиснення поліненасичених жирних кислот [151]. Наші результати показали, що вміст ТБК-активних сполук перевищував контрольні показники одразу після введення та впродовж 14 діб після відміни цефтриаксону. Активація ПОЛ може призводити до порушення

проникності клітинних мембран, гальмування окисного фосфорилування в мітохондріях, пригнічення синтезу ДНК та поділу клітин, що сприяє розвитку хронічного рецидивуючого запалення [152]. Очевидно, ці зміни є результатом порушення активності ферментів антиоксидантного захисту. У відповідь на порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, тканини найчастіше спочатку відповідають підвищенням активності ферментів антиоксидантної системи. Проте, тривалий оксидативний стрес виснажує ресурси організму, що призводить до дисбалансу активності ферментів антиоксидантного захисту [153], що і спостерігалось після введення цефтриаксону.

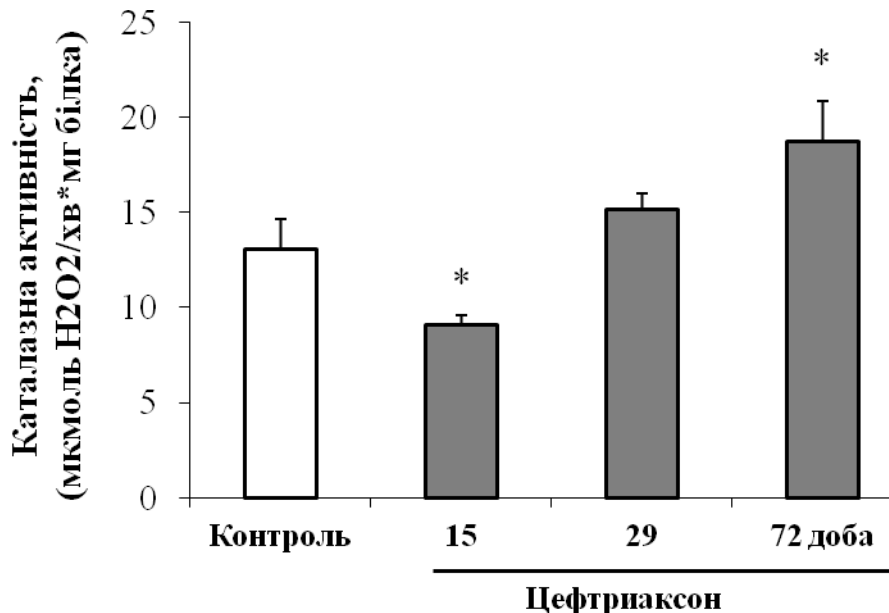


Рис. 4.3. Каталазна активність у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); $M \pm m$; контроль ($n = 15$), цефтриаксон ($n = 15$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Описані зміни свідчать про порушення окисно-антиоксидантного балансу клітин слизової оболонки товстої кишки після введення цефтриаксону та можуть призводити до незворотного пошкодження клітин, включаючи розриви ДНК, агрегацію або фрагментацію білків, а також

дисфункцій клітинних мембран [154]. Наслідком такого впливу є порушення бар'єрної функції, яке, зокрема, може спричинити підвищення проникності слизової оболонки товстої кишки із наступним розвитком запалення [100]. Показано, що оксидативний стрес є одним з основних механізмів, залучених в патогенез запальних захворювань кишечника [102, 154]. Згідно даних Фоменко [155], оксидативні реакції (зростання концентрації ТБК-активних сполук та коливання активності ферментів антиоксидантного захисту) створюють передумови для розвитку деструктивних ушкоджень слизової оболонки товстої кишки за умов водно-імобілізаційного та адреналін-індукованого стресу.

Наші спостереження розширюють розуміння ролі кишкової мікробіоти в підтриманні гомеостазу клітин слизової оболонки та взаємозв'язку тривалого використання антибіотиків і розвитку запалення товстої кишки. Виявлені нами дисбіотичні порушення мікробіоти та зниження продукції масляної кислоти, яка виконує важливу роль в енергозабезпеченні ентероцитів, можуть призводити до змін енергетичного метаболізму колоноцитів після введення антибіотика. Дефіцит енергії призводить до змін окисно-відновного стану клітин слизової оболонки товстої кишки та зниження інтенсивності окисного фосфорилування і, як результат, розвитку оксидативного стресу [156], що відповідає змінам, виявленим у мишей-гнотобіонтів [47]. Оксидативний стрес, в свою чергу, може асоціюватись з розвитком прозапальних змін в кишечнику внаслідок антибіотикотерапії [157].

4.1.2. Рівень редокс-чутливих транскрипційних факторів у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону

Відомо, що окисники, крім цитотоксичності, можуть модулювати численні редокс-чутливі сигнальні шляхи, які залучені до регуляції дегенеративних патофізіологічних станів [153]. Активні форми кисню

змінюють активність редокс-чутливих транскрипційних факторів шляхом окиснення SH-груп цистеїну білкової молекули [158].

Введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводило до зниження вмісту білкових тіолових груп в 1,9 раза ($p < 0,05$) на 15 добу експерименту (рис. 4.4). На 29 добу не спостерігалось повного відновлення вмісту білкових SH-груп в слизовій оболонці товстої кишки щурів ($p = 0,08$), проте на 72 добу значення відповідало контролю.

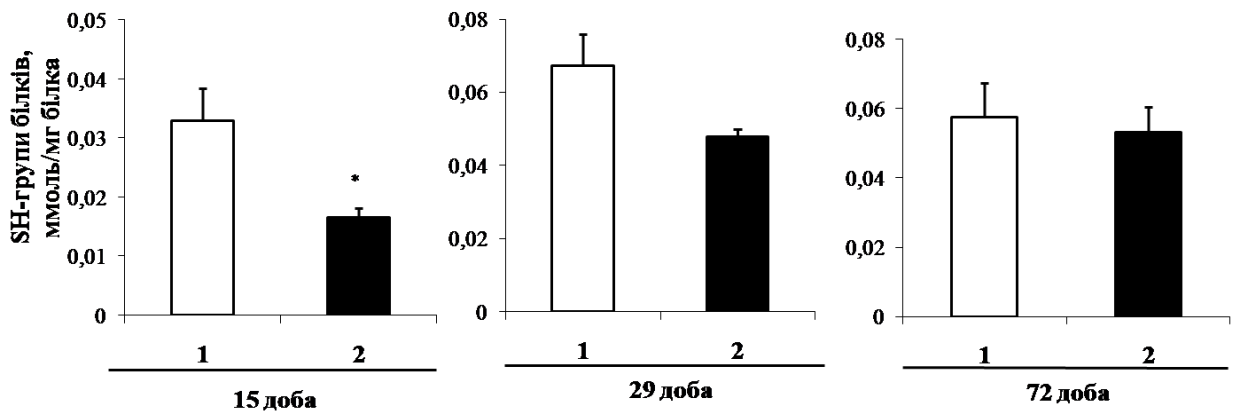


Рис. 4.4. Вміст тіолових груп білків у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м., 14 діб); $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 15$), 2 – цефтриаксон ($n = 15$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Зниження вмісту білкових тіолових груп після введення антибіотика поряд із порушенням оксидантно-антиоксидантного балансу може свідчити про зміни окисно-відновного потенціалу в слизовій оболонці товстої кишки, що передбачає активацію редокс-чутливих транскрипційних факторів та сигнальних шляхів. До таких факторів, зокрема, належить Egr-1 (білок ранньої відповіді 1), Sp-1 (специфічний білок 1) та NF1 α (фактор1 α , що індукується гіпоксією).

Визначення рівня редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 на перший день після 14-добового введення цефтриаксону показало

тенденцію до його підвищення порівняно з контролем, однак отримані значення не були статистично вірогідними (рис. 4.5А, Б). Ми припустили, що

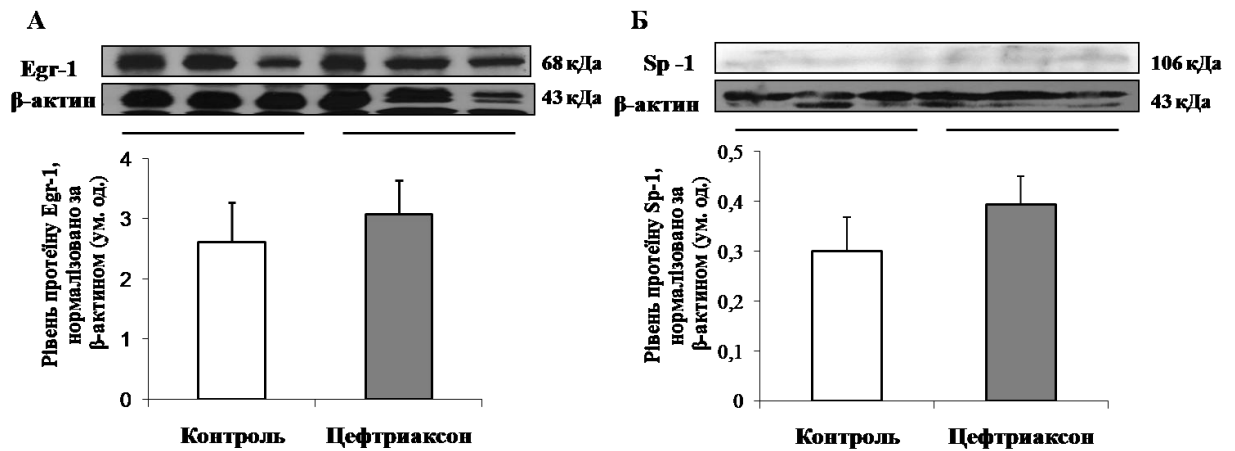


Рис. 4.5. Рівень транскрипційних факторів Egr-1 (А) та Sp-1 (Б) у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м.); контроль (n = 3), цефтриаксон (n = 3); Вестерн-блот аналіз; $M \pm m$.

це пов'язано з тим, що Egr-1 та Sp-1 є редокс-чутливими транскрипційними факторами ранньої відповіді [159-160], активація яких пов'язана з початком розвитку оксидативного стресу. Тому ми перевірили рівень даних білків у слизовій оболонці товстої кишки щурів на 6 добу експерименту. Так, 5-добове введення цефтриаксону спричинювало підвищення рівня редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 порівняно з контролем в 1,8 ($p < 0,05$) та 1,4 раза ($p < 0,05$), відповідно (рис. 4.6).

Оскільки важливим пусковим механізмом структурно-функціональних змін клітин за умов порушення балансу між продукцією активних форм кисню та їх знешкодженням антиоксидантною системою є розвиток гіпоксії, ми визначили рівень транскрипційного фактора, який репрезентує стан гіпоксії тканини, а саме HIF1α. Результати досліджень показали, що рівень HIF1α зростав в 1,9 раза ($p < 0,05$), порівняно з контрольними значеннями, в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону на 15 добу експерименту (рис.4.7).

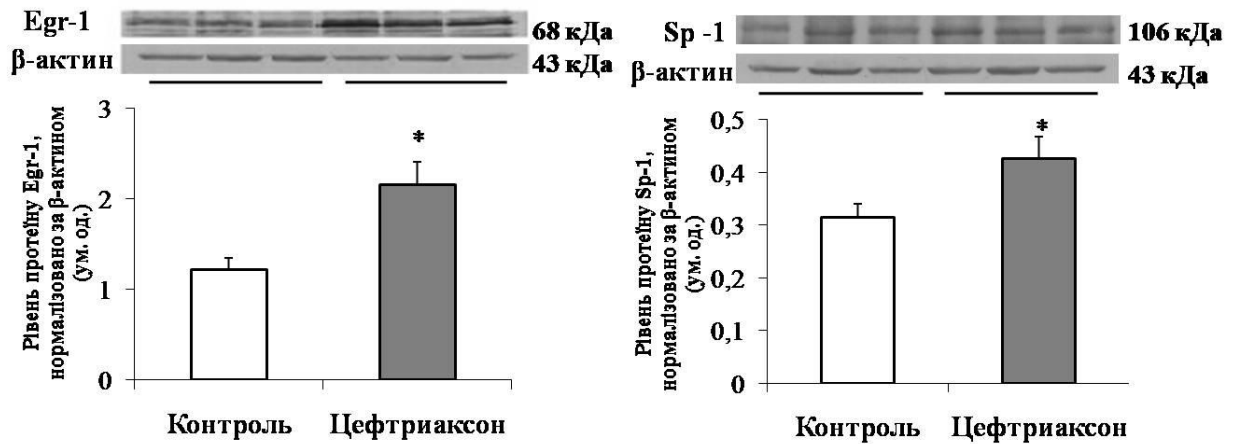


Рис. 4.6. Рівень транскрипційних факторів Egr-1 (А) та Sp-1 (Б) у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м.); контроль (n = 3), цефтриаксон (n = 3); Вестерн-блот аналіз; $M \pm m^* - p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Відомо, що Egr-1 і Sp-1 відіграють важливу роль в патогенезі виразкової хвороби [161-163]. Зокрема, Khomenko і співавт. [164] показали збільшення рівня білка та мРНК Egr-1 на ранніх стадіях цистеамін-викликаного виразки дванадцятипалої кишки. Підвищення рівня протеїну Egr-1 та його транслокації в ядро клітин слизової оболонки товстої кишки було виявлено під час розвитку йодоацетамід-індукованого виразкового коліту у щурів [163].

Egr-1 – це протеїн «ранньої відповіді», відноситься до групи редокс-чутливих транскрипційних факторів, що швидко активується при порушенні оксидативного балансу [160]. Egr-1 здатний активувати гени багатьох факторів з ангіогенною активністю (bFGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF, VEGFR-1, ангіопоектин-1, протеази), а також прозапальних медіаторів (ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , IL-1 β , IL-2, хемотаксичний білок моноцитів-1, тканинний фактор GM-CSF) шляхом взаємодії з сайтом зв'язування ДНК проксимальної промоторної ділянки гена або шляхом міжбілкової взаємодії з іншими транскрипційними факторами [160, 163]. Редокс-чутливий транскрипційний

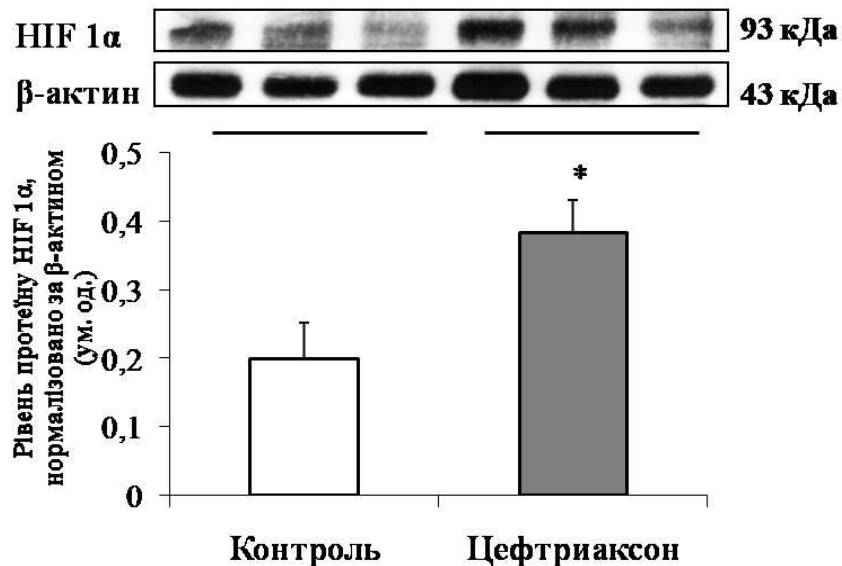


Рис. 4.7. Рівень транскрипційного фактору HIF1 α в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м.); Вестерн-блот аналіз; контроль (n = 3), цефтриаксон (n = 3); M \pm m; * – p < 0,05 відносно показників у контрольній групі.

фактор Sp-1 відіграє важливу роль в регуляції таких клітинних процесів, як метаболізм, ріст, диференціація, ангіогенез і апоптоз [165]. Він бере участь в регуляції експресії генів білків домашнього господарства, експресії специфічних генів, які визначають напрямок комітації еритроїдного, моноцитарного і лімфоїдного ряду. Встановлено протекторну функцію Sp-1 у відповідь на збільшення вільних радикалів в нейронах головного мозку [159].

HIF1 α є основним клітинним механізмом координації транскрипції в умовах «фізіологічної гіпоксії» в кишечнику. HIF1 α регулює транскрипцію генів, що мають вирішальне значення для забезпечення бар'єрної функції епітелію, синтезу муцинів та енергетичних процесів у клітинах [166]. Оскільки запалення та гіпоксія нерозривно пов'язані між собою [10], підвищення рівня HIF1 α в слизовій оболонці товстої кишки після введення цефтриаксону є додатковим свідченням розвитку прозапальних змін у відповідь на порушення окисно-антиоксидантного балансу.

4.1.3. Рівень активації ERK1/2 та p38 MAP-кіназних шляхів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону

Порушення окисно-антиоксидантного балансу в слизовій оболонці товстої кишки та активація експресії редокс-чутливих транскрипційних факторів опосередковується MAP-кіназним каскадом, зокрема ERK1/2 та p38. Тому далі нами було досліджено рівень активації (за рівнем фосфорильованих форм) ERK1/2 та p38 MAP-кіназних шляхів передачі сигналу в клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів після введення цефтриаксону. Введення антибіотика протягом 14 днів супроводжувалось зростанням рівня фосфорилування ERK1/2 MAP-кіназ у 5,8 раза ($p < 0,05$), що свідчить про активацію ERK1/2-сигнального каскаду (рис. 4.8).

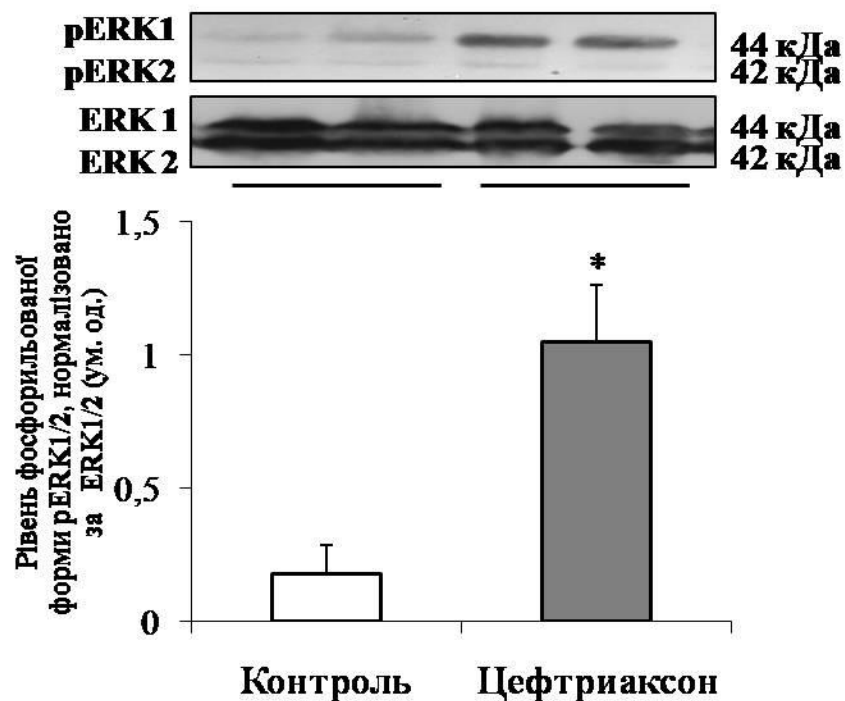


Рис. 4.8. Рівень фосфорилування ERK1/2 MAP-кіназ у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м.); Вестерн-блот аналіз; $M \pm m$; контроль ($n = 4$), цефтриаксон ($n = 4$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Дослідження р38 MAP-кіназ показало зниження співвідношення фосфорильованої форми рр38 до рівня р38 у слизовій оболонці товстої кишки щурів в 1,3 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями після введення цефтриаксону на 15 добу експерименту (рис. 4.9).

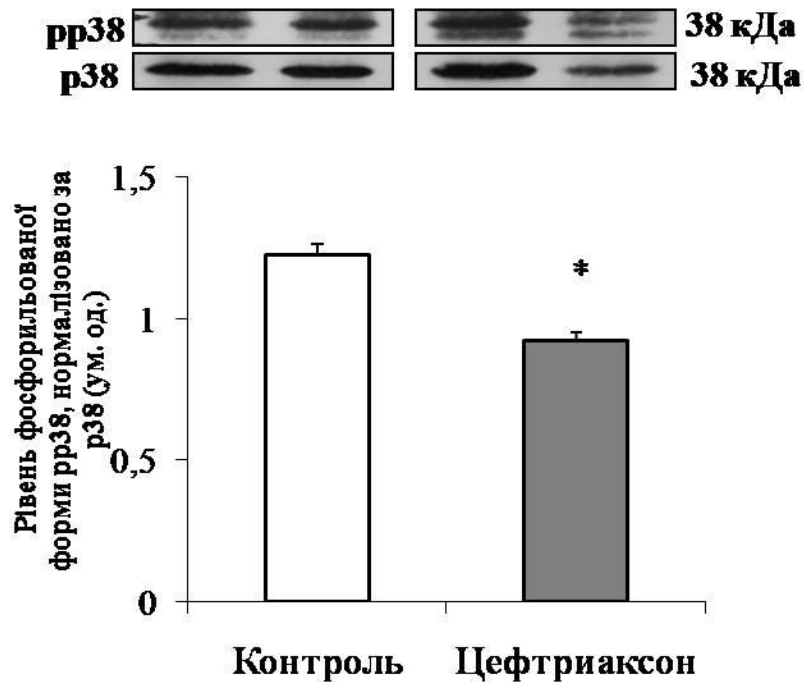


Рис. 4.9. Рівень фосфорилування р38 MAP-кіназ у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтриаксону (300 мг/кг, в. м.); Вестерн-блот аналіз; $M \pm m$; контроль ($n = 4$), цефтриаксон ($n = 4$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Отже, введення цефтриаксону приводить до активації ERK1/2 та знижує активність р38 MAP-кіназних шляхів. Активація ERK1/2 може бути пов'язана з підвищеним рівнем активних форм кисню [167]. Крім того, КЛЖК можуть також викликати залежне від часу фосфорилування ERK1/2 через зв'язування з FFA2 і FFA3 рецепторами [18]. Активовані MAP-кінази каталізують фосфорилування численних субстратних білків, включаючи фактори транскрипції, протеїнкінази і фосфатази, а також інших функціональних білків [168].

p38 MAP-кінази регулюють клітинну відповідь на стрес, а також мають важливе значення під час розвитку запалення [169]. Показано, що функції p38 відрізняються в окремих тканинах [170], що необхідно враховувати для розуміння ролі p38 при різних захворюваннях. Миші, в яких в епітеліальних клітинах кишки специфічно інактивована p38, більш сприйнятливі до розвитку коліту, викликаного декстрансульфатом натрію або 2,4,6-тринітробензилсульфоною кислотою [170-171]. Ці миші виглядали здоровими, але характеризувалися порушенням кишкового гомеостазу, яке проявлялось підвищеною проліферацією епітеліальних клітин кишечника, внаслідок активації ERK1/2 і JNK сигнальних шляхів, та зниженою кількістю слиз-продукуючих клітин у слизовій оболонці кишечника [170].

Отже, виявлене нами підвищення фосфорилування ERK1/2 після введення цефтриаксону може бути безпосередньо пов'язаним зі зниженням активності p38. Крім того, показано, що p38 регулює експресію зонула оклюдину 1 (ZO-1) впливаючи таким чином на формування щільних контактів між епітеліальними клітинами кишечника. Про це свідчить також підвищення кишкової проникності після інактивації p38 в клітинах епітелію кишечника. Варто відзначити, що введення пробіотика VSL#3 усувало ці зміни та призводило до зниження епітеліальної проникності [171]. Ці дані підтверджують участь мікробіоти в підтриманні кишкового гомеостазу шляхом регуляції активності MAP-кіназних шляхів.

4.2. Зміни вуглеводного складу поверхневого слизу кишечника щурів після введення антибіотика цефтриаксону

Введення цефтриаксону впродовж 14 діб не впливало на концентрацію глікопротеїнів поверхневого слизу тонкої кишки щурів в усі досліджувані терміни (рис. 4.10). В товстій кишці достовірних змін концентрації

глікопротеїнів на 15-ту та 29-ту добу також не спостерігалось. Однак на 72 добу експерименту цей показник зменшувався в 1,3 раза ($p < 0,05$) відносно показників в контрольній групі (рис. 4.11, А).

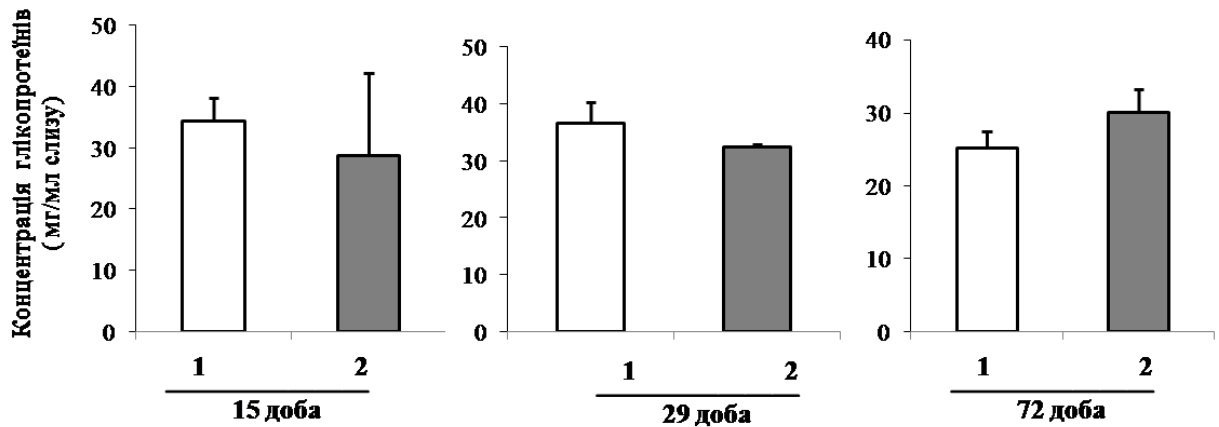


Рис. 4.10. Концентрація глікопротеїнів поверхневого слизу тонкої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): реакція з реактивом Фоліна після виділення сульфосаліциловою кислотою; $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 12$), 2 – цефтриаксон ($n = 12$).

На відміну від методу визначення концентрації глікопротеїнів, який базується на зв'язуванні реактиву Фоліна з білковою частиною молекули [120], Шиф-реакція дозволяє детектувати гліканову частину глікопротеїнів. Шиф-реакція (рис. 4.11, Б) виявила зниження відносного вмісту глікопротеїнів в 1,9 раза ($p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі) на 72 добу експерименту.

Таким чином, зміни у складі слизового бар'єру пов'язані не лише із зниженням загальної кількості глікопротеїнів, а також зі змінами їх вуглеводного компоненту.

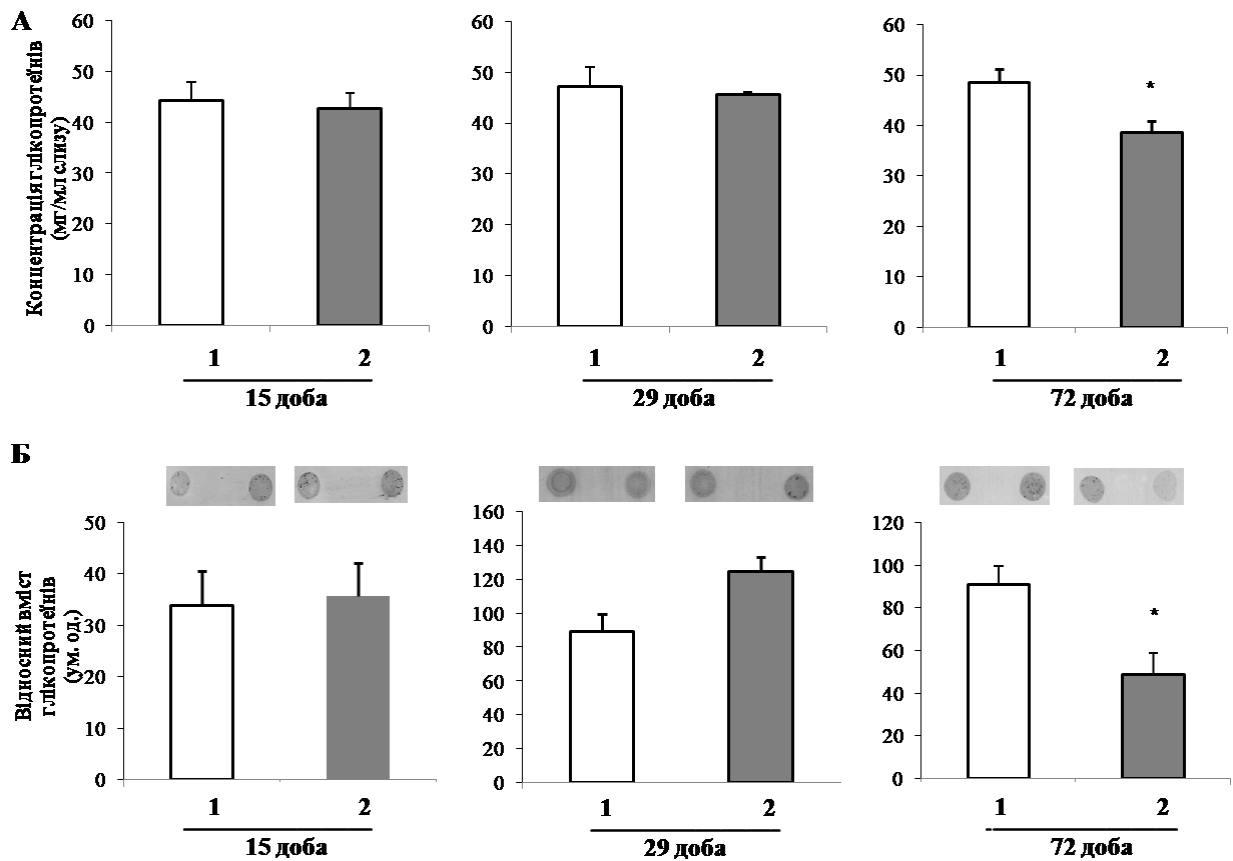


Рис. 4.11. Рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб): А – реакція з реактивом Фоліна після виділення сульфосалциловою кислотою; Б – метод Шиф-реакції на PVDF-мембрані; $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 12$), 2 – цефтриаксон ($n = 12$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Відомо, що резистентність слизової оболонки кишечника значною мірою залежить не тільки від вмісту глікопротеїнів, але і від складу та довжини їх бокових вуглеводних ланцюгів, які захищають поліпептиди від протеолізу, а також обмежують проникнення макромолекул, включаючи бактеріальні токсини, до клітин епітелію [172]. Тому доцільно оцінювати не лише загальну кількість глікопротеїнів поверхневого слизу, а і якісний склад їх вуглеводних залишків, зокрема вміст гексоз, гексозамінів, фукози та сіалових кислот.

Концентрація гексоз у складі поверхневого слизу товстої кишки щурів достовірно не змінювалась одразу після відміни цефтриаксону. Проте на 72 добу експерименту спостерігалось зниження концентрації гексоз в 1,2 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями (рис. 4.12). Це відповідало зменшенню загальної кількості глікопротеїнів, отриманої напівкількісним методом за допомогою Шиф-реакції.

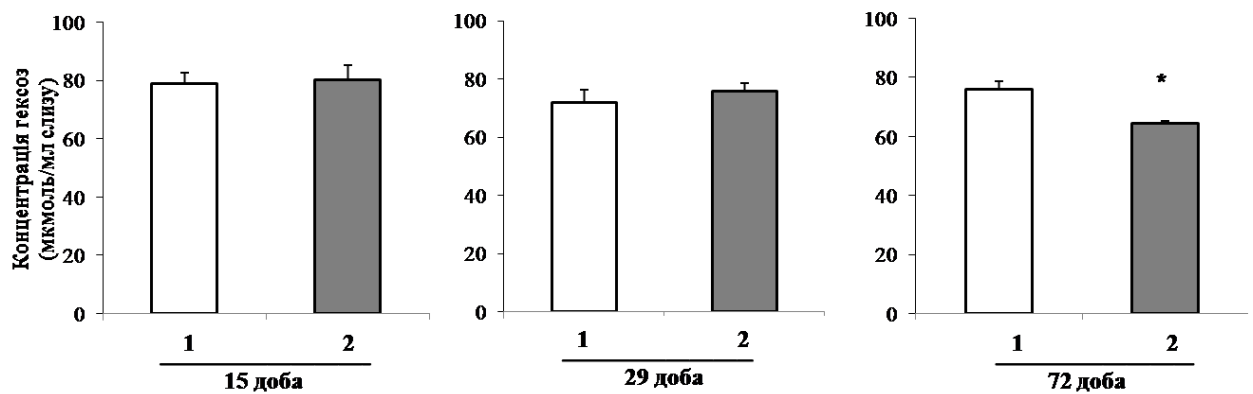


Рис. 4.12. Концентрація гексоз у поверхневому слизі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 12$), 2 – цефтриаксон ($n = 12$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Також спостерігалось достовірне зниження концентрації фукози, яке посилювалось з часом. Так, на 29 добу експерименту (через 14 діб після відміни цефтриаксону) концентрація фукози знижувалась в 1,4 раза, на 72 добу – в 1,3 раза ($p < 0,05$) (рис.4.13). Отримані результати підтверджують поступове виникнення якісних змін глікопротеїнів слизу у віддалені терміни після введення цефтриаксону, що можуть супроводжуватись вкороченням вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів.

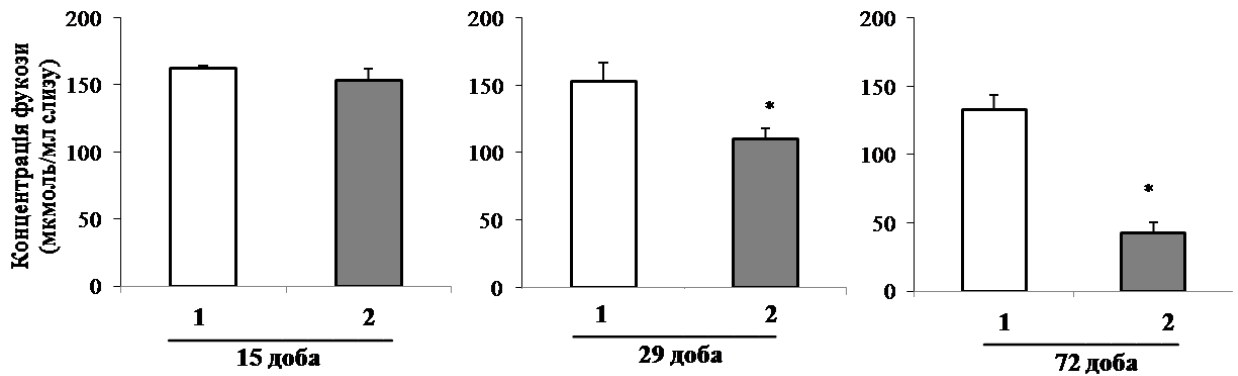


Рис. 4.13. Концентрація фукози у поверхневому слизі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг в.м., 14 діб); $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 12$), 2 – цефтриаксон ($n = 12$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Далі ми визначили вміст гексозамінів, які локалізуються переважно в коровій частині гліканів муцину [88-89]. Дослідження складу поверхневого слизу товстої кишки щурів не показало достовірних змін концентрації гексозамінів у різні терміни після введення цефтриаксону (рис. 4.14).

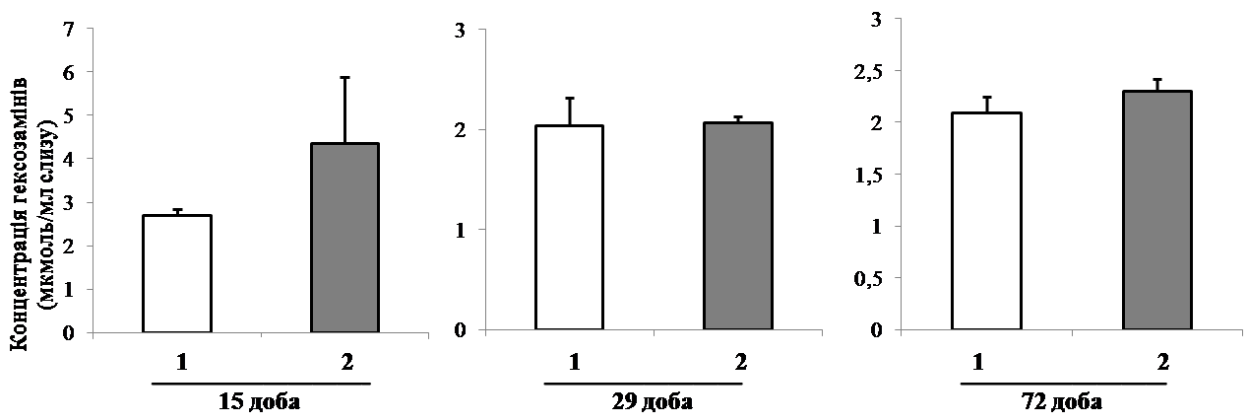


Рис. 4.14. Концентрація гексозамінів у поверхневому слизі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг в.м., 14 діб); $M \pm m$; 1 – контроль ($n = 12$), 2 – цефтриаксон ($n = 12$).

На кінцях олігосахаридних ланцюгів молекул глікопротеїнів розташовані залишки сіалових кислот. Зокрема, як зазначалось, сіалування GalNAc в положенні C6 термінує подовження гліканового ланцюга [88]. Ми відмічали збільшення концентрації сіалових кислот в 1,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 4.15).

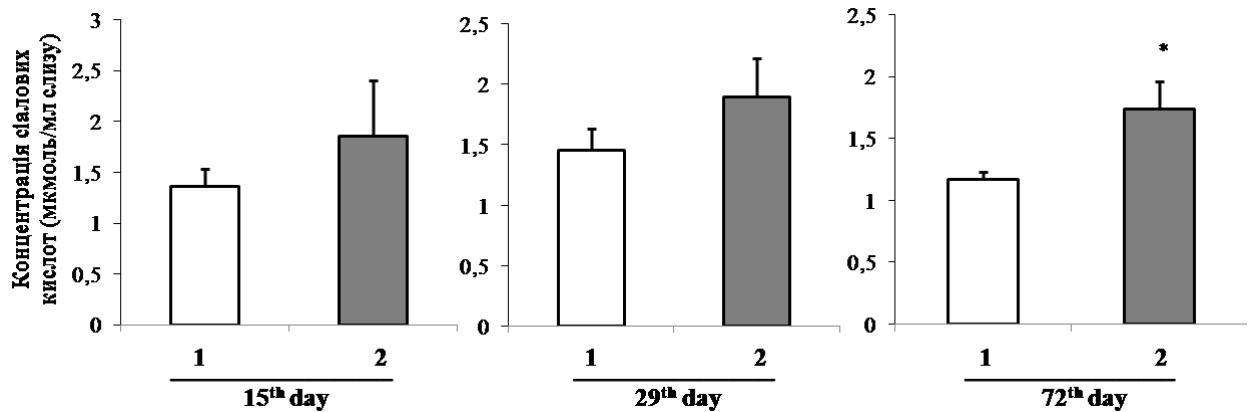


Рис. 4.15. Концентрація сіалових кислот у поверхневому слизі товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг в.м., 14 діб); $M \pm m$; $n = 24$; 1 – контроль ($n = 12$), 2 – цефтриаксон ($n = 12$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Отже, введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводить до порушення стану поверхневого слизового бар'єру товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіютика. На 72 добу експерименту знижується загальна кількість глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів. Це супроводжується якісними змінами структури гліканової частини муцинів, а саме зниженням концентрації гексоз і фукози. В той час як кількість гексозамінів не змінюється, а рівень сіалювання глікопротеїнів слизу зростає.

Виявлені нами зміни концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки співпадають у часі зі зрушеннями у складі мікробіоти фекалій щурів. Ці дані, а також відсутність змін концентрації глікопротеїнів

термінального відділу тонкої кишки, дозволяють нам припустити провідну роль мікробіоти у підтриманні цілісності слизового бар'єру. Разом з тим, ці зміни свідчать про зниження стійкості слизового бар'єру у віддалені терміни після антибіотикотерапії та можуть призводити до порушення кишкового гомеостазу. На користь цього припущення є дані Wlodarska та ін. [11]. Встановлено, що прийом метронідазолу підвищує сприйнятливність мишей до *C. rodentium*-індукованого коліту за рахунок зниження товщини внутрішнього шару слизу і, як результат, підвищеної прозапальної бактеріальної стимуляції епітелію.

Виявлені зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни цефтриаксону можуть свідчити про порушення посттрансляційної модифікації муцинів. Це призводить до вкорочення вуглеводних ланцюгів молекули глікопротеїну та передчасного їх термінування залишками сіалових кислот. Оскільки глікозилювання муцинів є динамічним процесом та модулюється експресією специфічних глікозилтрансфераз, ці зміни можуть виникати за рахунок підвищення рН в апараті Гольджі, опосередкованого запальними цитокінами, що утворилися в результаті взаємодії мікробіоти з поверхнею епітелію кишечника [173].

Відсутність змін у концентрації гексозамінів на фоні зниження вмісту глікопротеїнів може свідчити про вкорочення олігосахаридної частини молекул. Так показано [174], що обробка глікопротеїнів нормального слизу розчином слабкої кислоти, яка індукує відщеплення залишків фукози та сіалових кислот, підвищує кількість Thomsen-Friedenreich (TF) антигену – галактозо- β -1,3-N-ацетилгалактозаміну ($\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha$ -), який є коровою вуглеводною структурою O-зв'язаних олігосахаридів муцину. Подібні зміни виявляли у зразках слизу хворих на виразковий коліт та аденокарциному кишечника. Отже, підвищення вмісту TF антигену в складі муцинів можна пояснити зниженням фукозилювання глікопротеїнів [175].

Підвищення сіалювання муцинів є типовим при запальних захворюваннях кишечника [94]. Так, у складі слизу товстої кишки пацієнтів з

виразковим колітом виявлялось підвищення вмісту коротких О-зв'язаних антигенів, таких як сіаліл Тn (сіаліл- α 2,6N-ацетилгалактозамін α -зв'язаний з серином або треоніном білкового кору) [176].

Описані зміни можуть призводити до порушення в'язкості слизу та впливають на його взаємодію з мікроорганізмами, електролітами, захисними білками а, отже, знижують ефективність функцій слизового шару. Порушення слизового бар'єру призводить до дисрегуляції взаємодії між клітинами епітелію, імунними клітинами власної пластинки слизової оболонки та кишковою мікробіотою. Надмірна дія мікробних антигенів супроводжується вивільненням епітеліальними клітинами запальних цитокінів та хемокінів, таких як інтерлейкін (ІЛ) 1, ІЛ-6, ІЛ-8, фактор некрозу пухлин (ФНП), інтерферон гамма (ІФН γ), і хемокіну CCL2, що призводить до рекрутингу й активації лейкоцитів [177]. Нейтрофіли першими відповідають на ушкодження слизового бар'єру та виникнення трансепітеліального градієнту мікробних і клітинних хемоатрактантів. Активовані нейтрофіли виділяють ряд протеаз, які мають потенційний вплив на функціонування епітеліального бар'єру шляхом зміни структури і функцій епітеліальних міжклітинних контактів. В результаті, дисфункція епітеліального бар'єру, може підтримувати патологічне запалення слизової оболонки [98].

4.3. Активність матриксних металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтриаксону

Протеолітичні ферменти (протеїнази) є основними факторами, що сприяють руйнуванню та оновленню компонентів позаклітинного матриксу при різних фізіологічних і патологічних процесах, таких як ремоделювання тканин, загоєння ран, ангіогенез, деструктивні захворювання, ріст пухлин та запальні реакції, включаючи запалення слизової оболонки, пов'язане із ЗЗК

[178-179]. Ми припустили, що порушення слизового бар'єру може індукувати прозапальні зміни в слизовій оболонці товстої кишки. Ряд досліджень показав, що експресія ММП-2 і ММП-9 посилюється під час запалення слизової оболонки товстої кишки пацієнтів із ЗЗК та корелює з активністю хвороби [180-181]. Тому наступним етапом нашого дослідження було з'ясувати желатиназну активність матриксних металопротеїназ в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону.

Введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводило до поступового зростання желатиназної активності ММП-9 у слизовій оболонці товстої кишки щурів, яка на 72 добу експерименту була в 1,7 раза ($p < 0,05$) вищою відносно показників у контрольній групі (рис. 4.16).

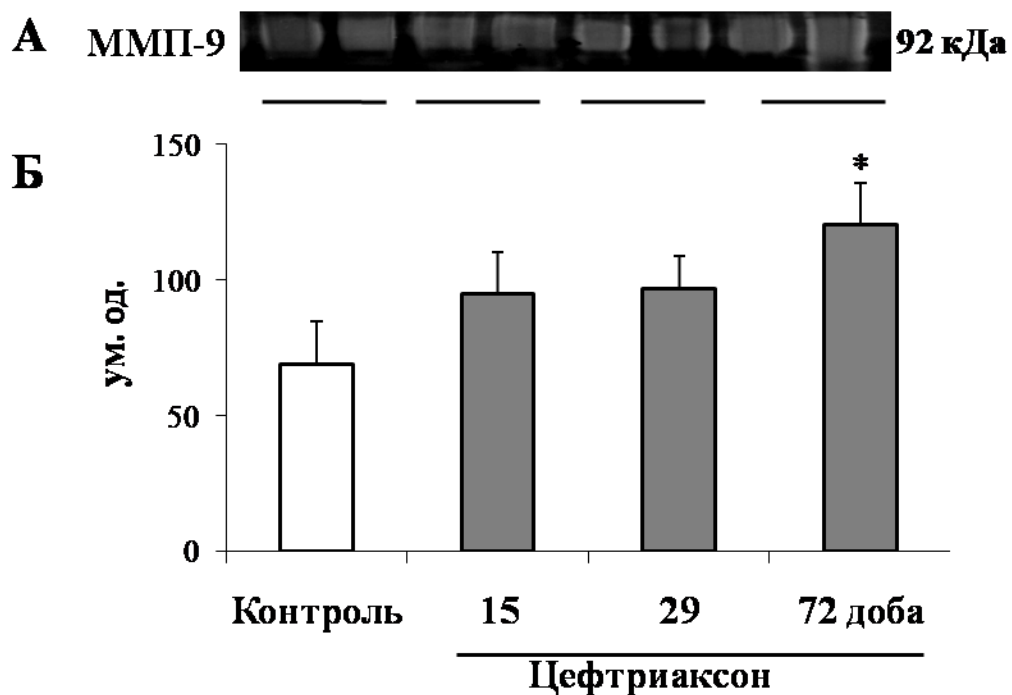


Рис. 4.16. Желатиназна активність матриксної металопротеїнази-9 (ММП-9) у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); А – електрофореграма після детекції активності ММП, Б – результати денситометрії; $M \pm m$; контроль ($n = 4$), цефтриаксон ($n = 12$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Разом з тим на 72 добу експерименту спостерігалось зниження вмісту про-ММП-2 та активності ММП-2 в 1,6 ($p < 0,05$) і 2,2 рази ($p < 0,05$), відповідно (рис. 4.17).

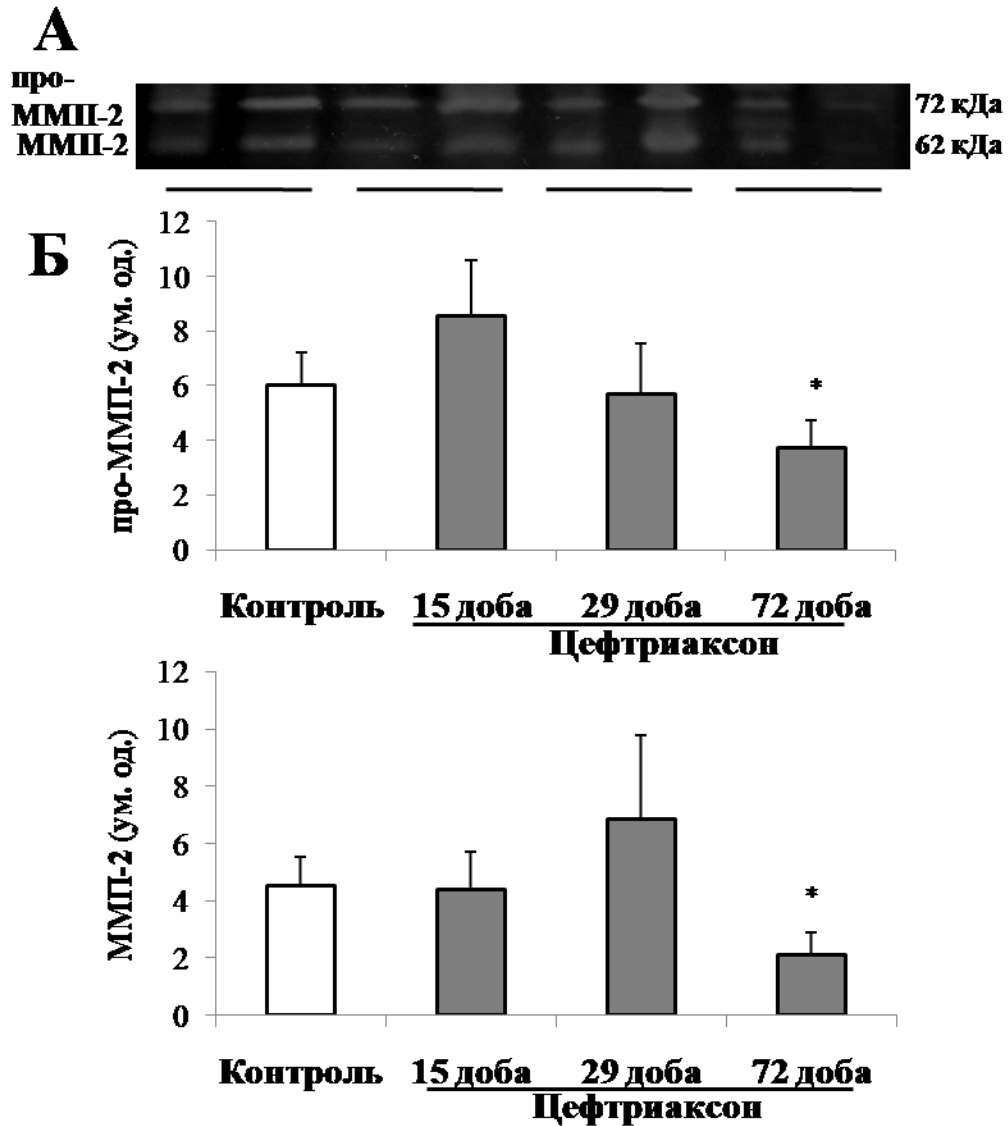


Рис. 4.17. Желатиназна активність зимогену матричної металопротеїнази-2 (про-ММП-2) та матричної металопротеїнази-2 (ММП-2) в слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтриаксону (300 мг/кг, в.м., 14 діб); А – електрофореграма після детекції активності ММП, Б – результати денситометрії; $M \pm m$; контроль ($n = 4$), цефтриаксон ($n = 12$); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Отже активність ММП-9 зростала, а ММП-2, навпаки, знижувалась у віддалені терміни після введення цефтриаксону впродовж 14 днів. Згідно літературних даних, ММП-9 є медіатором запальної реакції і пошкодження тканини, оскільки надмірна експресія погіршує загоєння виразок епітелію кишечника [182] та збільшує виділення прозапальних цитокінів [183]. ММП-9^{+/} миші, характеризуються зниженою інтенсивністю запалення та меншим ушкодженням слизової оболонки за умов експериментального коліту, в той час як ММП-2^{+/} миші були високочутливими до коліту, викликаного як декстран сульфатом натрію так і бактеріями *Salmonella enterica serovar Typhimurium* [184]. Крім того, показано, що ММП-2^{+/} миші характеризуються порушенням функціонування кишкового бар'єру та підвищеною проникністю епітелію кишечника [185]. Отже, ММП-2 захищають від розвитку запальної відповіді під час коліту. Це дозволяє припустити, що підвищення активності ММП-9, та зниження – ММП-2 в слизовій оболонці товстої кишки щурів підвищуватиме сприйнятливність до розвитку ЗЗК у віддалені терміни після введення цефтриаксону. Варто зазначити, що ці зміни розвиваються на фоні порушення функціонування слизового бар'єру товстої кишки щурів після антибіотикотерапії.

Висновки до розділу

1. Введення цефтриаксону викликало порушення окисно-антиоксидантного балансу в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Збільшення вмісту ТБК-активних сполук на 15 добу експерименту асоціювалось з дисбалансом активності ферментів антиоксидантного захисту.
2. У відповідь на оксидативний стрес знижувався вміст білкових тіолових груп, що виявлялось активацією редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1 на 6 добу експерименту, та підвищенням рівня HIF 1 α

– на 15 добу. Ці зміни супроводжувалися активацією ERK1/2 та зниженням активності p38 MAP-кіназ.

3. Введення цефтриаксону індукувало віддалені в часі зміни концентрації та вуглеводного складу глікопротеїнів слизу товстої кишки щурів. На 72 добу експерименту спостерігалось вірогідне зниження концентрації глікопротеїнів, гексоз і фукози поверхневого слизу товстої кишки щурів та підвищення рівня сіалових кислот.

4. Зрушення у окисно-антиоксидантному балансі та складі слизу в слизовій оболонці товстої кишки щурів за введення цефтриаксону супроводжується посиленням активності матриксних металопротеїназ ММП-9 та зниженням ММП-2 в слизовій оболонці товстої кишки щурів.

РОЗДІЛ 5

СТУПІНЬ СПРИЙНЯТЛИВОСТІ ЩУРІВ ДО РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТУ У ВІДДАЛЕНІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

5.1. Проникність епітелію товстої кишки щурів у віддалені терміни після введення цефтриаксону

Виходячи з отриманих результатів розвитку дисбіотичних змін мікробіоти товстої кишки, порушення стану слизового бар'єру та підвищення активності матриксних металопротеїназ у віддалені терміни після введення цефтриаксону ми припустили, що ці зміни можуть свідчити про порушення інтегративної цілісності епітеліального бар'єру. З метою підтвердження порушення бар'єрної функції товстої кишки у віддалені терміни після введення антибіютика ми визначили проникність епітелію за кількістю фарби Еванса, що проникала в кровоносне русло із просвіту ізольованої ділянки товстої кишки.

Одразу після відміни цефтриаксону (15 доба експерименту) проникність епітелію товстої кишки щурів мала тенденцію до зниження, але ці зміни не були статистично вірогідними (рис. 5.1А). Так, кількість фарби Еванса в 30-ти хвилинній пробі крові (за період від 30 до 60 хв після введення фарби) щурів, яким вводили цефтриаксон, становила $0,015 \pm 0,003$ мг/мл плазми, а у контрольній групі тварин – $0,028 \pm 0,018$ мг/мл плазми. Однак кількість фарби в крові через 60 хв після введення у просвіт товстої кишки була подібною для обох груп тварин (цефтриаксон – $0,047 \pm 0,010$ мг/мл плазми; контроль – $0,046 \pm 0,012$ мг/мл плазми).

На 72 добу експерименту, кількість фарби Еванса, яка проникла в кров за 30 хв була вищою в 2,7 раза ($p < 0,05$) у щурів, яким вводили цефтриаксон,

порівняно з контрольною групою (рис. 5.1. Б). Через 60 хв концентрація фарби Еванса в крові щурів, яким вводили цефтриаксон, все ще в 2 рази ($p < 0,05$) перевищувала контрольні значення. Таким чином, введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводить до порушення епітеліальної проникності товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіютика.

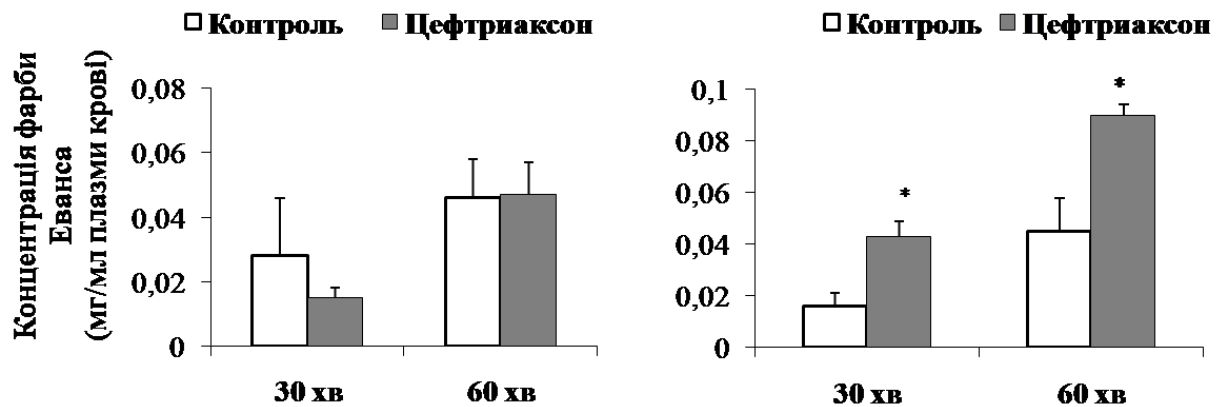


Рис. 5.1. Концентрація фарби Еванса в крові щурів через 30 та 60 хв після її введення у просвіт товстої кишки на 15 (А) та 72 (Б) добу експерименту: контроль ($n = 8$), цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), $n = 8$; $M \pm m$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Результатом збільшення проникності епітелію товстої кишки може бути транслокація бактерій з просвіту у системний кровотік. Тому ми визначили загальну кількість мікроорганізмів (lgКУО) у пробі крові з ворітної вени щурів після введення цефтриаксону. Результати досліджень показали, що на 15 добу кількість мікроорганізмів в крові щурів статистично вірогідно не відрізнялась після введення цефтриаксону (рис. 5.2. А). Однак на 72 добу експерименту кількість мікроорганізмів в крові ворітної вени щурів, яким вводили цефтриаксон, в 1,6 рази ($p \leq 0,05$) перевищувала контрольні показники (рис. 5.2. Б).

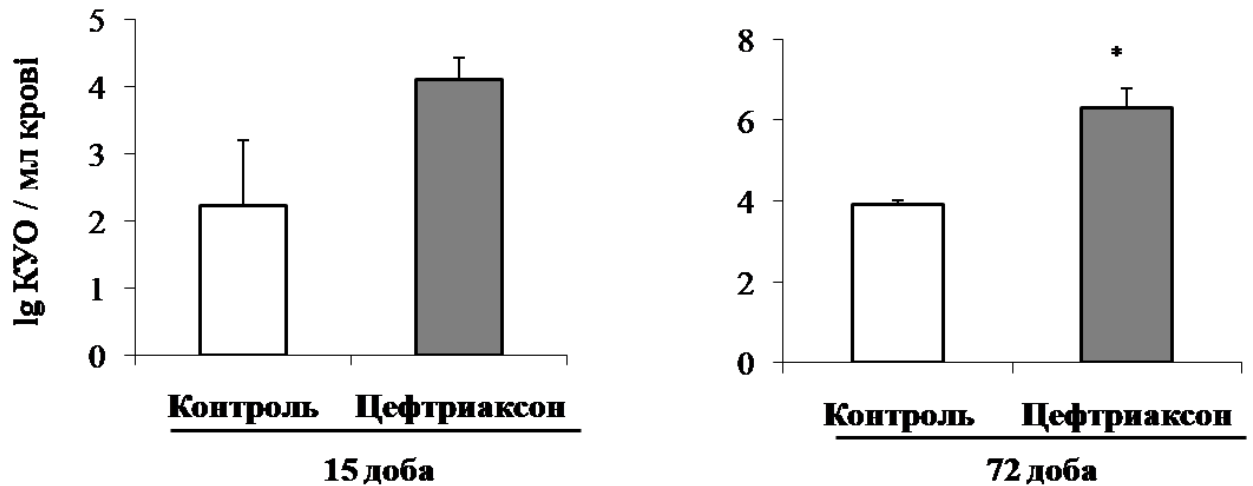


Рис. 5.2. Загальна кількість мікроорганізмів (IgKYO/мл) в крові портальної вени щурів на 15 (А) та 72 (Б) добу експерименту: контроль (n = 8), цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), n = 8; $M \pm m$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Отже, введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводить до збільшення проникності епітелію товстої кишки та транслокації бактерій у кров у віддалені терміни після відміни антибіотика.

Дослідження Tulstrup зі співав. [134], використовуючи маркер FITC-декстран з молекулярною масою 4 кДа, показали, що пероральне введення щурам цефотаксиму (антибіотик цефалоспоринового ряду) або ванкоміцину впродовж 10 днів знижує проникність кишечника щурів одразу після курсу введення антибіотиків. Навпаки, введення метронідазолу призводило до збільшення концентрації FITC-декстрану порівняно з контролем. Тому автори дійшли до висновку, що епітеліальна проникність залежить від класу антибіотиків. Наші дослідження показали, що проникність епітелію товстої кишки щурів не змінюється одразу після відміни цефтриаксону, однак зростає на 72 добу експерименту. Це супроводжувалось посиленням транслокації мікроорганізмів у системний кровотік. Транслокація мікроорганізмів може здійснюватись трансцелюлярним і парацелюлярним шляхами [186] та є нормальним явищем, яке відбувається у здорових людей

[187]. Припускають, що такий фізіологічний механізм дозволяє підтримувати толерантність імунної системи до нормобіоти кишечника [188]. Однак надмірна проліферація бактерій, пошкодження кишкового бар'єру та системна імуносупресія можуть призводити до бактеріємії. Зокрема, посилення мікробної транслокації внаслідок пошкодження кишкового бар'єру асоціюється з розвитком септичних ускладнень та системного запалення [189-191]. Отже, спостережуване нами збільшення кількості бактерій в крові портальної вени щурів у віддалені терміни після введення цефтриаксону свідчить про дисрегуляцію взаємодії між клітинами епітелію, імунними клітинами власної пластинки слизової оболонки та мікробіоти кишечника. Отримані результати відповідають спостереженню Кноор та співав. [12], які показали, що пероральне ведення ампіциліну, метронідазолу, неоміцину та ванкоміцину викликає транслокацію симбіотичних мікроорганізмів через епітелій товстої кишки. Посилення бактеріальної транслокації виникало внаслідок проходження антигенів, асоційоване з келихоподібними клітинами (GAPs - goblet cells-associated antigen passages) та потребувало наявності CX3CR1⁺ дендритних клітин.

Порушення кишечного бар'єру, з наступною транслокацією бактерій через стінку кишки, вважається одним із основних факторів патогенезу ЗЗК [192] оскільки надмірна активація імунної системи нормальною резидентною мікрофлорою спричиняє поступове виснаження місцевого імунітету з наступним спотворенням імунної відповіді на подразники різного генезу. Таким чином, отримані результати вказують на те, що антибіотикотерапія може впродовж тривалого часу впливати на функціонування епітеліального бар'єру кишечника та підвищувати сприйнятливість до розвитку ЗЗК.

5.2. Макроскопічні та морфометричні показники перебігу експериментального коліту у віддалені терміни після введення цефтриаксону

Спостережуване порушення проникності епітелію товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіотика може призводити до прозапальних змін, які підвищуватимуть сприйнятливність до розвитку запальних захворювань кишечника. Щоб перевірити дану гіпотезу, на 72 добу експерименту у щурів, яким вводили цефтриаксон, ми викликали експериментальний коліт. Одноразове введення 3% йодоацетаміду є достатнім, щоб викликати запалення в слизовій оболонці товстої кишки через 6-12 год [127]. Ми вивчали зміни в товстій кишці через 6 годин після введення йодоацетаміду для того, щоб з'ясувати вплив попереднього введення цефтриаксону на перебіг процесів, що передують розвитку масового ушкодження слизової товстої кишки.

Попереднє введення цефтриаксону не впливало на загальний ступінь перебігу експериментального коліту, площу ураження та площу товстої кишки, що втратила складки. Проте, маса товстої кишки була збільшена на 21,9% ($p \leq 0,05$), поперечний переріз стінки – 15,5% ($p \leq 0,05$) і набряк – на 53,8% ($p \leq 0,05$) за попереднього введення цефтриаксону в порівнянні з контрольною групою коліту (рис 5.3). Таким чином, попереднє введення цефтриаксону інтенсифікує набряк та розширення товстої кишки щурів під час експериментального коліту.

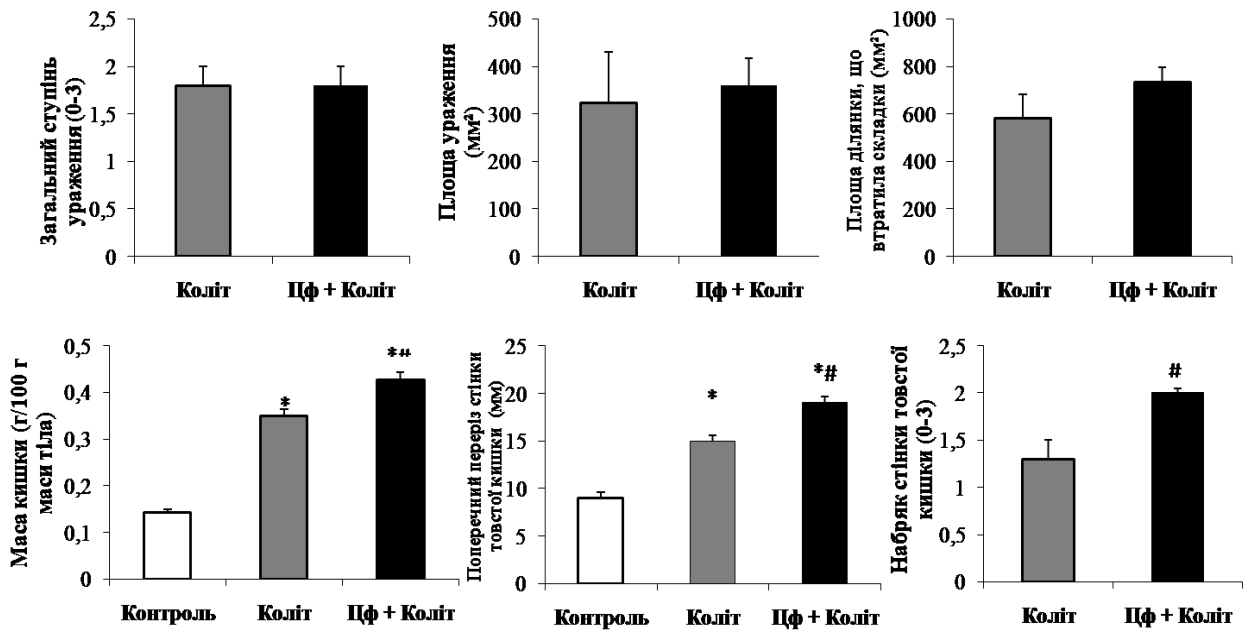


Рис. 5.3. Макроскопічні показники перебігу експериментального коліту через 56 днів після відміни цефтриаксону (72 доба експерименту): загальний ступінь ураження, площа ураження, площа ділянки, що втратила складки, маса кишки, поперечний переріз стінки товстої кишки, набряк стінки товстої кишки; контроль (n = 5); Цф – цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), n = 5; коліт – 3% йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год (n = 5); $M \pm m$; n = 15; * p < 0,05 порівняно з контрольними показниками; # p < 0,05 у порівнянні з групою коліту.

Гістологічне дослідження показало, що введення цефтриаксону впливає на морфометричні показники епітелію товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіотика (72 доба експерименту). Зокрема, у щурів, яким вводили цефтриаксон, товщина слизової оболонки товстої кишки була знижена на 13,5% (p < 0,05), глибина крипт – 15,2% (p < 0,05), висота ентероцитів – 23,6% (p < 0,05) і площа ядер ентероцитів – 46,6% (p < 0,05) порівняно з контрольною групою тварин (рис. 5.4).

Товста кишка щурів з експериментальним колітом характеризувалися руйнуванням слизової оболонки, наявністю виразок, абсцесів крипт і набряком підслизової. Товщина слизової оболонки товстої кишки, глибина

крипт, висота ентероцитів та площа ядер ентероцитів були значно зниженими, що вказує на перебіг атрофічних процесів за умов експериментального коліту.

Попереднє введення цефтриаксону посилювало гістопатологію експериментального коліту у щурів, що характеризувалось зниженням на 16,2% ($p < 0,05$) товщини слизової оболонки товстої кишки і на 21,7% ($p < 0,05$) висоти ентероцитів в порівнянні з групою коліту (рис. 5.4).

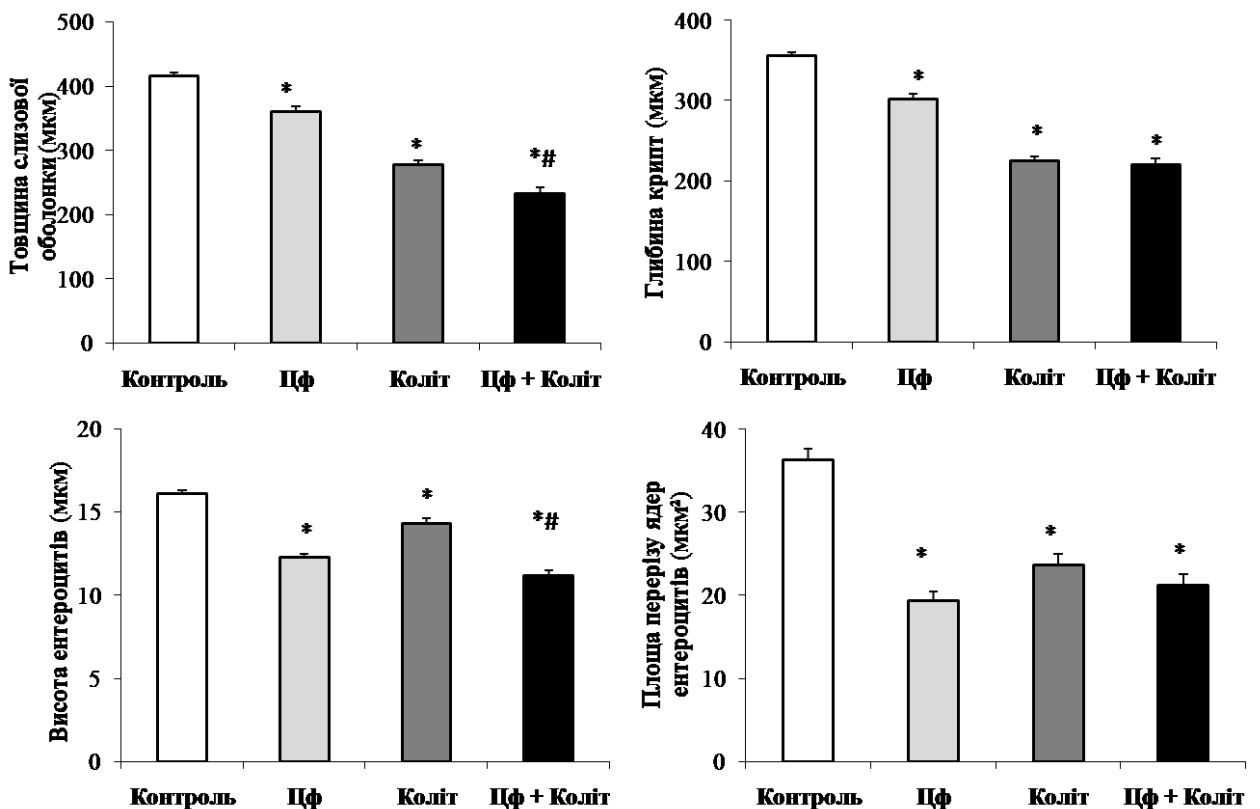


Рис. 5.4. Морфометричні показники стінки товстої кишки щурів з експериментальним колітом, викликаним через 56 днів після відміни цефтриаксону (72 доба експерименту): товщина слизової оболонки, глибина крипт, висота ентероцитів і площа перерізу ядер ентероцитів; контроль ($n = 5$); Цф – цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), $n = 5$; коліт – 3% йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год ($n = 5$); Цф+ коліт ($n = 5$); $M \pm m$; * $p < 0,05$ порівняно з контрольними показниками; # $p < 0,05$ у порівнянні з групою коліту.

Введення цефтриаксону впродовж 14 днів призводить до гіпертрофії келихоподібних клітин на 72 добу експерименту (рис. 5.5). Площа поперечного перерізу та кількість келихоподібних клітин перевищували контрольні показники в 2 та 1,2 рази ($p \leq 0,05$), відповідно. Під час експериментального коліту спостерігалось зменшення площі келихоподібних клітин. У щурів з експериментальним колітом після попереднього введення цефтриаксону кількість келихоподібних клітин в криптах знижувалась на 18,2% в порівнянні з контрольними тваринами, однак площа поперечного перерізу була на 35,9% ($p \leq 0,05$) вищою контрольних значень. Проте, беручи до уваги той факт, що цефтриаксон провокує гіпертрофію келихоподібних клітин в товстій кишці, ці зміни можна охарактеризувати не як збільшення від нормального стану, а як зменшення від значно гіпертрофованого стану (Цф + коліт – $92,3 \pm 5,4 \text{ мкм}^2$; цефтриаксон – $139,1 \pm 7,7 \text{ мкм}^2$).

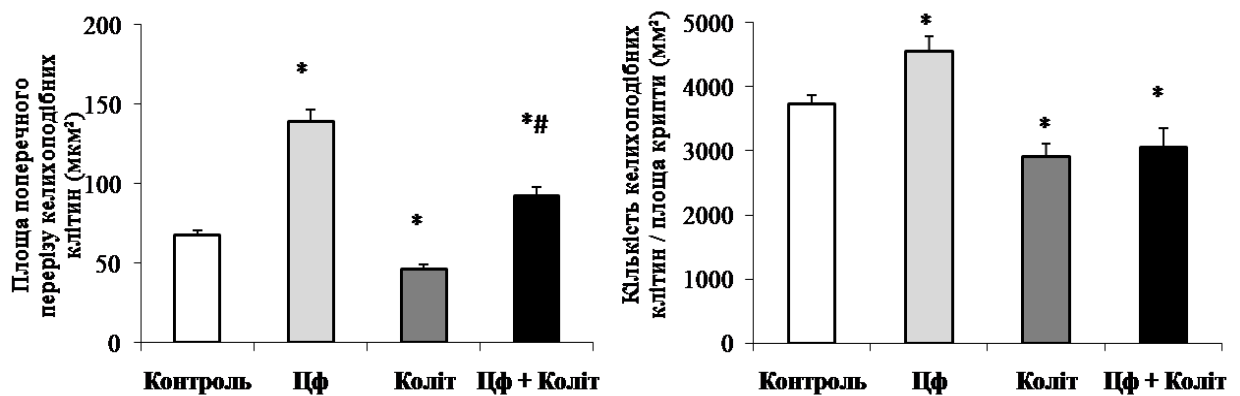


Рис. 5.5. Площа поперечного перерізу та кількість келихоподібних клітин у слизовій оболонці товстої кишки щурів за умов експериментального коліту через 56 днів після відміни цефтриаксону (72 доба експерименту); контроль ($n = 5$); Цф – цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), $n = 5$; коліт – 3% йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год ($n = 5$); Цф+ коліт ($n = 5$); $M \pm m$; * $p < 0,05$ порівняно з контрольними показниками; # $p < 0,05$ у порівнянні з групою коліту.

Відомо, що на перебіг запалення в шлунково-кишковому тракті може суттєво впливати дегрануляція тучних клітин [193]. Введення цефтриаксону характеризується дегрануляцією тучних клітин товстої кишки щурів, що виявлялось у зменшенні кількості гранул в клітинах, на 37,6% ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами на 72 добу експерименту (рис. 5.6). За умов експериментального коліту спостерігалась ще більш виражена дегрануляція тучних клітин. Так, кількість гранул була зменшена на 67,2% ($p < 0,05$ порівняно з контролем). Подібні процеси спостерігались за умов експериментального коліту після попереднього введення цефтриаксону.

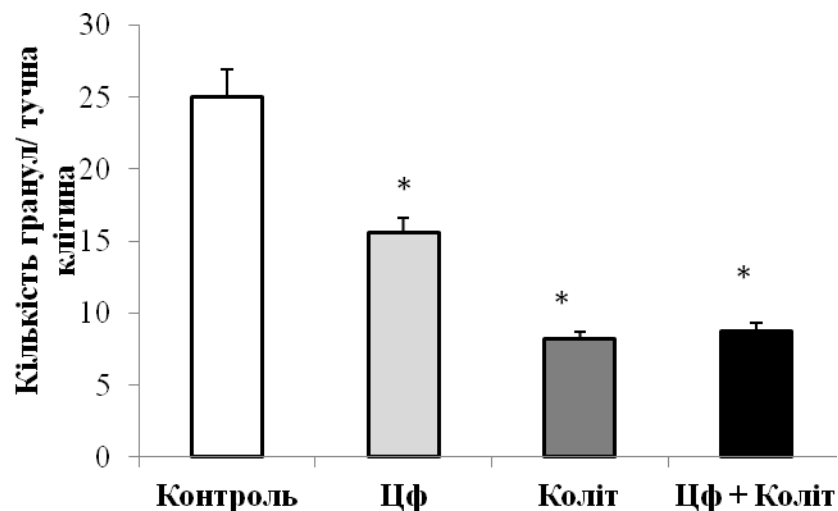


Рис. 5.6. Рівень дегрануляції тучних клітин у слизовій оболонці товстої кишки щурів за умов експериментального коліту через 56 днів після відміни цефтриаксону (72 доба експерименту); контроль ($n = 5$); Цф – цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), $n = 5$; коліт – 3% йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год ($n = 5$); Цф+ коліт ($n = 5$); $M \pm m$; * $p < 0,05$ порівняно з контрольними показниками; # $p < 0,05$ у порівнянні з групою коліту.

Отже, проведене нами дослідження показало, що попереднє введення цефтриаксону може посилювати перебіг запалення у віддалені терміни після

введення антибіотика. Це асоціювалось з інтенсифікацією набряку товстої кишки та посиленням гістопатологічних показників розвитку коліту. Підвищена сприйнятливість до експериментального коліту виникала на тлі цефтриаксон-індукованого зменшення товщини слизової оболонки товстої кишки, глибини крипт, висоти ентероцитів, площі перерізу ядер ентероцитів, гіпертрофії келихоподібних клітин та дегрануляції тучних клітин слизової оболонки товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіотика (72 доба експерименту).

Отримані результати узгоджуються з проведеним недавно ретроспективним клінічним дослідженням [194], яке показало, що прийом антибіотиків впродовж чотирьохрічного періоду, пацієнтами із ЗЗК, як в схемах терапії ЗЗК так і з інших причин, супроводжувався більш важким клінічним перебігом захворювання. Пацієнти, які приймали антибіотик, мали підвищений рівень С-реактивного білка, який є неспецифічним маркером активного запалення і можливої інфекції. Підвищення рівня С-реактивного білка корелює з підвищення активності захворювання у пацієнтів із ЗЗК.

Епітелій кишечника є тканиною, яка найшвидше самооновлюється в організмі людини. Цей процес регулюється популяцією кишкових мультипотентних стовбурових клітин, які знаходяться на дні крипти. Функціонування та диференціація стовбурових клітин залежить від сигналів мікрооточення [195], яке залишається суттєво зміненим впродовж тривалого часу після антибіотикотерапії [15]. У відповідь такий вплив у слизовій оболонці товстої кишки можуть відбуватись структурні зміни: змінюється товщина слизової оболонки, глибина крипт, висота ентероцитів.

Відомо, що зміни складу кишкової мікробіоти можуть істотно впливати на перебіг запалення слизової оболонки кишечника [196-197]. Зниження кількості резидентних мікроорганізмів (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes* і *Firmicutes*), які зазвичай захищають кишковий епітелій від інвазії патогенів, а також збільшення умовно-патогенних бактерій (наприклад, ентероадгезивних та інвазивних *Escherichia coli*), може сприяти

запаленню через їх здатність до адгезії і проникнення в епітеліальні клітини кишечника, з подальшим виділенням прозапальних цитокінів [198].

Отже, спостережуване підвищення сприйнятливості щурів до розвитку експериментального коліту є наслідком порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єру у віддалені терміни після антибіотикотерапії.

5.3. Рівень ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові щурів з експериментальним колітом у віддалені терміни після відміни цефтриаксону

Виділення прозапальних і протизапальних цитокінів – характерна особливість патогенезу запальних захворювань. Ми перевірили, як змінюється активність цих процесів під час експериментального коліту після попереднього введення цефтриаксону.

Під час розвитку експериментального коліту у щурів виявляли вірогідне підвищення рівня як прозапальних (ФНП- α) так і протизапальних (ІЛ-10) цитокінів. Зокрема, через 6 год після введення йодоацетаміду концентрація ФНП- α в сироватці крові щурів (рис. 5.7 А) підвищувалась в 2,9 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з показниками, отриманими через 56 днів після введення цефтриаксону (72 доба експерименту). Концентрація цитокіну ІЛ-10 (рис. 5.7 Б) на тлі експериментального коліту також підвищувалась в 3,3 раза ($p \leq 0,05$). У щурів з експериментальним колітом після попереднього введення цефтриаксону рівні ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові були вищими в 1,3 раза ($p = 0,05$), порівняно з групою коліту (рис. 5.7).

Таким чином, інтенсифікація запалення за умов експериментального коліту після попереднього введення цефтриаксону асоціювалась з підвищенням рівня запальних цитокінів ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові щурів.

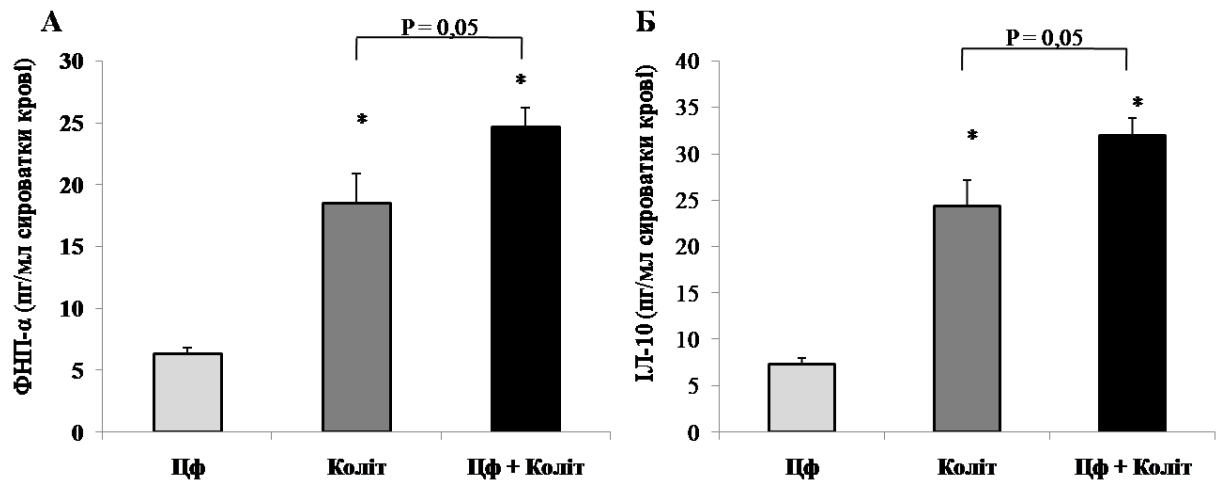


Рис. 5.7. Концентрація ФНП- α (А) та ІЛ-10 (Б) у сироватці крові щурів з експериментальним колітом, індукованим введенням 3% йодоацетаміду на 72 добу експерименту; Цф – цефтриаксон (300 мг/кг, в.м., 14 діб), $n = 5$; коліт – 3% йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год ($n = 5$); Цф+ коліт ($n = 5$); $M \pm m$; * $p < 0,05$ порівняно з групою цефтриаксон.

Вплив резидентної мікробіоти на імунну систему є дуалістичним за своєю природою. З одного боку активуються механізми які підтримують толерантність і запобігають запаленню, з іншого боку, кишкова мікробіота може активувати ефекторні лімфоцити. Недостатня імунна відповідь (при зустрічі потенційних патогенів), або посилення активації імунної системи (до харчових антигенів або нормобіоти) свідчить про порушення цього гомеостазу, що є потенційною загрозою розвитку запалення в кишечнику [199]. Одним з механізмів регуляції імунного гомеостазу кишки є продукція цитокінів імунними клітинами, такими як нейтрофіли, макрофаги, дендритні клітини, лімфоцити та тучні клітини. Тому збалансоване виділення прозапальних (наприклад, ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-23) і протизапальних медіаторів (наприклад, трансформуючий фактор росту β , ІЛ-10) є важливим для запобігання розвитку запалення [200].

Показано, що ФНП- α відіграє ключову роль в патогенезі ЗЗК [201]. Даний цитокін опосередковує множинні прозапальні сигнали, в тому числі рекрутинг нейтрофілів до місць запалення, активацію коагуляції та фібринолізу, а також індукцію формування гранульоми. Тому антитіла, які запобігають зв'язуванню ФНП- α з його рецептором (наприклад, інфліксімаб) є одним з найбільш ефективних лікарських засобів для лікування ЗЗК [202].

ІЛ-10 є ключовим медіатором підтримки кишкового гомеостазу, що обмежує і в кінцевому підсумку веде до припинення імунних реакцій [203]. У мишей, нокаутуваних за ІЛ-10 спонтанно розвиваються ентероколіт, тому вони широко використовуються в якості генетичної моделі ЗЗК [204-205].

Тому, індуковане попереднім введенням цефтриаксону, посилення виділення як прозапального ФНП- α , так і протизапального ІЛ-10 під час експериментального коліту вказує на те, що антибіотикотерапія підвищує сприйнятливність до розвитку коліту за рахунок посилення імунної відповіді до ульцерогенних чинників.

Висновки до розділу

1. Встановлено, що введення цефтриаксону не викликало вірогідних змін у проникності епітелію товстої кишки щурів на 15 добу експерименту, проте підвищувало її на 72 добу, що призводило до транслокації бактерій у кров.

2. Підвищення проникності епітелію супроводжувалось гістологічними змінами в слизовій оболонці товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіотика (72 доба експерименту), зокрема, зменшенням товщини слизової оболонки товстої кишки, глибини крипт, висоти ентероцитів та площі перетину їх ядер, гіпертрофією келихоподібних клітин і дегрануляцією тучних клітин.

3. Введення цефтриаксону підвищувало чутливість щурів до експериментального коліту, викликаного у віддалені терміни після введення

антибіотика, про що свідчило посилення набряку та розширення стінки товстої кишки, а також збільшення рівнів запальних цитокінів ІЛ-10 та ФНП- α у сироватці крові.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Шлунково-кишковий тракт колонізований мікроорганізмами, кількість яких в 10 разів перевищує загальну кількість всіх клітин організму, а видове різноманіття складає близько 1000 видів [206-207]. Встановлено, що мікробіота виконує ряд важливих функцій, які забезпечують гомеостаз макроорганізму: пригнічує ріст патогенних мікроорганізмів, стимулює імунну систему, регулює всмоктування поживних речовин та метаболізм макроорганізму, здійснює розщеплення харчових волокон, синтезує вітаміни тощо [208]. Тому зміни складу кишкової мікробіоти можуть призводити до порушення регуляції фізіологічного та імунологічного гомеостазу кишечника.

Одним з основних чинників, що може суттєво впливати на стан мікробіоти, є використання антибіотиків. Загальноприйнято вважати, що вплив антибіотиків на мікробіоту організму є тимчасовим і обмежується тривалістю курсу антибіотикотерапії. Однак, недавні дослідження показали, що антибіотики викликають стійкі зміни складу мікробіоти тривалістю не менше місяця після завершення короткого курсу антибіотикотерапії [15, 34, 209].

Порушення комплексної взаємодії між мікробіотою і макроорганізмом є одним з критичних факторів патогенезу ЗЗК [210-211]. В 2011 році двома незалежними групами дослідників були вперше опубліковані результати епідеміологічних досліджень щодо взаємозв'язку між тривалим застосуванням антибіотиків та ризиком розвитку запальних захворювань кишечника у дітей [8] та дорослих (середній вік 43,4 роки) [9]. Встановлено, що тривала антибіотикотерапія вірогідно підвищує ризик розвитку виразкового коліту та хвороби Крона у дорослих та дітей [10, 12]. Однак механізми такого взаємозв'язку залишаються недостатньо з'ясованими.

Наше дослідження показало, що якісний і кількісний склад кишкової мікробіоти суттєво змінюється у віддалені терміни після введення антибіотика цефтриаксону. На 72 добу (через 56 днів після відміни цефтриаксону) кількість умовно-патогенних та гемолітичних бактерій перевищує контрольні значення у 5,6 ($p < 0,05$) та 1,5 ($p < 0,05$) рази відповідно. Лактозопозитивні бактерії *Escherichia coli* не детектувались одразу після курсу введення антибіотика (15 доба), що, очевидно, пов'язано з антимікробними властивостями препарату, однак на 72 добу їх кількість перевищує контрольні показники в 1,4 рази ($p < 0,05$). Крім того спостерігається зсув у напрямку збільшення відносного вмісту лактозонегативних *E. coli*. Варто зазначити, що кількість облигатних анаеробних представників мікробіоти, біфідобактерій та лактобактерій не змінювалась в усі досліджувані терміни. Це свідчить, що внутрішньоєм'язове введення терапевтичних доз антибіотика не порушує стабільність нормобіоти.

Мікробіота кишечника перебуває в тісному метаболічному зв'язку з макроорганізмом, вагома роль у здійсненні якого належить локальному синтезу КЛЖК [128-130]. Ці метаболіти є важливим енергетичним субстратом для ентероцитів, здатні модулювати імунні процеси, транспорт води і електролітів в ШКТ [16].

Нами встановлено, що на 15 добу експерименту введення цефтриаксону призводило до зниження вмісту оцтової, пропіонової, масляної кислот та загального вмісту КЛЖК у фекаліях щурів в 2,9, 13,8, 8,5, 4,8 рази ($p < 0,05$), відповідно. Вміст валеріанової, ізовалеріанової і капронової кислот був нижче рівня детекції після введення цефтриаксону. Ці зміни супроводжувались зниженням в 4,3 рази ($p < 0,05$) значення анаеробного індексу та збільшенням відносного вмісту оцтової кислоти. На 72 добу вміст КЛЖК був все ще нижчим від контрольних значень, але вищим, ніж на 15 добу (за винятком пропіонової кислоти). Анаеробний індекс був зниженим в 1,3 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Ці зміни супроводжувались

збільшення маси сліпої кишки щурів, де відбуваються основні процеси синтезу КЛЖК у гризунів. Отже, антибактеріальна терапія викликає тривале порушення метаболічної активності мікробіоти товстої кишки.

Оскільки КЛЖК є основним енергетичним субстратом для ентероцитів [20], зниження їх вмісту може призводити до порушення гомеостазу клітин слизової оболонки товстої кишки. Показано, що пропіонова і масляна кислоти мають однаковий протизапальний потенціал, обумовлений пригніченням транскрипції NF- κ B, в той час як оцтова кислота виявляє значно меншу ефективність [51]. Оцтова кислота також може посилювати транскрипцію прозапальних генів та синтез цитокінів [140]. Тому збільшення відносного вмісту оцтової кислоти у фекаліях може вказувати на прозапальні властивості внутрішньопорожнинного середовища товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.

З фекаліями виводиться 5-10% від загальної кількості КЛЖК [16], тому спостережувані зміни характеризують лише частину синтезованих КЛЖК. В товстій кишці КЛЖК дуже ефективно всмоктуються шляхом пасивної дифузії, за участю Na^+ -залежних SMCT та протон-залежних MCT мембранних транспортерів [67, 142, 143]. За фізіологічних значень рН вмісту товстої кишки (5,6-6,6), КЛЖК перебувають в аніонній формі, що вказує на важливу роль транспортерів у їх всмоктуванні [143]. Проведене нами імуногістохімічне дослідження на 15 добу експерименту показало підвищення імунореактивності MCT1 та MCT4 транспортерів КЛЖК на базолатеральній мембрані ентероцитів, та зниження SMCT1 транспортера на щітковій облямівці ентероцитів СОТК щурів після введення цефтриаксону. Для більш глибокого розуміння наслідків цих змін необхідні подальші дослідження, однак варто зазначити, що подібні порушення експресії транспортерів КЛЖК були виявлені за умов канцерогенезу в кишечнику [20] та у мишей-гнотобіонтів [145], що свідчить про вагомую роль мембранних транспортерів у здійсненні фізіологічного впливу мікробіоти та її метаболітів на макроорганізм.

Сигнальні та імуномодуляторні функції КЛЖК здійснюються через взаємодію з FFA2 (GPR43) та FFA3 (GPR41) рецепторами [141]. FFA2 рецептори мають вищу спорідненість до оцтової кислоти [71], експресуються переважно на імунних клітинах та опосередковують ефект КЛЖК на перебіг запалення в кишечнику [53, 77]. Нами показана імунореактивність FFA2 рецепторів на келихоподібних клітинах та поверхневих ентероцитах слизової оболонки товстої кишки щурів. Після введення цефтриаксону впродовж 14 діб, імунореактивність FFA2 знижувалась. Результати Вестерн-блот аналізу показали зниження рівня FFA2 навіть на 72 добу експерименту. FFA3 рецептори, на відміну від FFA2, мають вищу спорідненість до масляної кислоти [212] та експресуються переважно в кишечнику, жировій тканині, клітинах підшлункової залози [17, 53]. Результати наших досліджень показали, що за умов норми, FFA3 рецептори локалізуються на поверхневих ентероцитах товстої кишки щурів, келихоподібних клітинах і нейронах ентеральних плетив, що відповідає результатам Nøhr зі співавт. [73]. Рівень FFA3 рецепторів після введення цефтриаксону знижувався на 15 добу експерименту, проте на 29 та 72 добу статистично вірогідно не відрізнявся від контрольних значень. Отже введення цефтриаксону викликає суттєві та тривалі зміни концентрації КЛЖК у фекаліях та рівня їх рецепторів і транспортерів у слизовій оболонці товстої кишки щурів, що свідчить про порушення процесів обміну метаболітами між мікробіотою та макроорганізмом.

Ми припустили, що зниження метаболічної активності мікробіоти кишечника після введення антибіотика може призводити до порушень окисно-антиоксидантного балансу в клітинах слизової оболонки товстої кишки. Результати дослідження показали підвищення вмісту ТБК-активних сполук в слизовій оболонці товстої кишки щурів на 15 і 29 добу експерименту в 6 та 2,5 раза ($p < 0,05$), відповідно, після введення цефтриаксону. Ці зміни супроводжувались дисбалансом активності ферментів антиоксидантного захисту. Показано, що оксидативний стрес є

одним з основних механізмів, залучених в патогенез ЗЗК [102-103]. Згідно даних Фоменко [155], оксидативні реакції створюють передумови для розвитку деструктивних ушкоджень слизової оболонки товстої кишки за умов водно-імобілізаційного та адреналін-індукованого стресу.

Порушення окисно-антиоксидантної рівноваги може модулювати численні редокс-чутливі сигнальні шляхи через окиснення SH-груп цистеїну білкових молекул. Нами було виявлено зниження вмісту білкових SH-груп в 1,9 раза ($p < 0,05$) після введення цефтриаксону, що передбачає активацію редокс-чутливих транскрипційних факторів. Враховуючи те, що Egr-1 та Sp-1 є редокс-чутливими транскрипційними факторами ранньої відповіді, які беруть участь в регуляції метаболізму, росту, диференціації, ангіогенезу і апоптозу [159-160], ми перевірили рівень даних протеїнів у слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5 та 14 добового введення цефтриаксону, відповідно на 6 та 15 добу експерименту. Вірогідне підвищення рівня Egr-1 та Sp-1 порівняно з контролем в 1,8 та 1,4 раза ($p < 0,05$), відповідно, було виявлено лише на 6 добу експерименту. Тоді як рівень гіпоксія-чутливого транскрипційного фактору HIF1 α в зростав в 1,9 раза ($p < 0,05$) на 15 добу експерименту. Ці зміни супроводжуються активацією ERK1/2 сигнального каскаду на тлі зниження активності p38 MAP-кіназних шляхів. Зазначені процеси є свідченням порушення гомеостазу клітин слизової оболонки товстої кишки щурів та вказують на розвиток прозапальних змін у відповідь на введення цефтриаксону.

Важливою складовою в підтриманні бар'єрної функції кишечника, є приепітеліальний шар слизу, секретований келихоподібними клітинами [95]. Порушення слизового бар'єру може відігравати важливу роль в патогенезі ЗЗК, зокрема, виразкового коліту [96]. Тому наступним етапом нашого дослідження було з'ясувати, як змінюється вуглеводний склад та загальна концентрація глікопротеїнів поверхневого слизу кишечника щурів у різні терміни після введення цефтриаксону, зокрема на 15, 29 та 72 добу експерименту.

Вірогідне зниження концентрації глікопротеїнів поверхневого слизу було виявлено лише на 72 добу експерименту. Це супроводжувалось якісними змінами структури олігосахаридних ланцюгів молекул глікопротеїнів, зокрема зниженням концентрації гексоз і фукози в 1,2 та 3,1 раза ($p < 0,05$), відповідно. Концентрація гексозамінів, які локалізуються переважно в коровій частині олігосахаридів муцину [88] не змінювалась на 72 добу експерименту, однак рівень сіалових кислот, які займають термінальне положення [89], збільшувався в 1,5 раза ($p < 0,05$). Виявлені зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни цефтриаксону свідчать про вкорочення вуглеводних ланцюгів молекули глікопротеїну та передчасне їх термінування залишками сіалових кислот [104, 175]. Подібний характер змін складу слизу є типовим під час розвитку ЗЗК. Описані зміни можуть призводити до порушення в'язкості слизу та зниження ефективності слизового шару [97, 104], що в свою чергу, є причиною порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єру.

Порушення гомеостазу слизової оболонки товстої кишки щурів підтверджувалось збільшенням протеолітичної активності матриксної металопротеїнази (ММП)-9 та зниженням – ММП-2 після введення цефтриаксону на 72 добу експерименту. Відомо, що ММП-9 є медіатором запальної реакції і пошкодження тканини, оскільки надмірна експресія погіршує загоєння виразок епітелію кишечника [182] та збільшує виділення прозапальних цитокінів [183]. Виявлені зміни можуть свідчити про підвищення проникності епітелію товстої кишки. На 72 добу експерименту ми спостерігали вірогідне ($p < 0,05$) підвищення проникності епітелію товстої кишки, яке визначали за кількістю фарби Еванса транслокованої із просвіту кишки в кров. Це також супроводжувалось збільшенням кількості мікроорганізмів у крові ворітної вени щурів у 1,6 раза ($p \square 0,05$).

Результати гістологічного дослідження дистального відділу товстої кишки щурів на 72 добу експерименту показали зменшення товщини

слизової оболонки товстої кишки, глибини крипт, висоти ентероцитів та площі поперечного перерізу їх ядер, що свідчить про розвиток атрофічних процесів в слизовій оболонці товстої кишки у віддалені терміни після виведення антибіотика. Ми припускаємо, що ці процеси є наслідком дисбіотичних змін складу та метаболічної активності мікробіоти товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.

Порушення бар'єрної функції призводить до дисрегуляції взаємодії між клітинами епітелію, імунними клітинами власної пластинки слизової оболонки та мікробіоти кишечника [213]. Надмірна дія мікробних антигенів супроводжується вивільненням епітеліальними клітинами запальних цитокінів та хемокінів, таких як інтерлейкін (ІЛ) 1, ІЛ-6, ІЛ-8, фактор некрозу пухлин, інтерферон гамма (ІФН γ), і хемокіну CCL2, що призводить до рекрутингу і активації лейкоцитів [177]. Підтвердженням цього є виявлена нами дегрануляція тучних клітин в товстій кишці щурів, яким вводили цефтриаксон. В результаті, дисфункція епітеліального бар'єру, може підтримувати патологічне запалення слизової оболонки. Однак, це не єдиний фактор, який робить внесок у розвиток ЗЗК. Так, родичі пацієнтів з хворобою Крона мали збільшену проникність епітелію кишечника, яка не супроводжувалась розвитком запалення, що підтверджує поліетіологічність ЗЗК [98].

Оскільки порушення кишечного бар'єру, з наступною транслокацією бактерій, вважається одним із основних факторів патогенезу ЗЗК [192], ми припустили, що вищенаведені зміни підвищуватимуть чутливість до дії ульцерогенних чинників. Для підтвердження даного припущення, у щурів, яким попередньо вводили цефтриаксон, на 72 добу експерименту було викликано експериментальний коліт. Встановлено, що введення цефтриаксону інтенсифікує набряк товстої кишки, що проявлялось збільшенням її маси та поперечного перерізу у порівнянні з групою коліту. Гістологічно ці зміни характеризувалось зниженням товщини слизової оболонки товстої кишки і висоти ентероцитів у порівнянні з групою коліту.

Крім того, у щурів з експериментальним колітом після попереднього введення цефтриаксону рівні ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові були вищими в 1,3 раза ($p = 0,05$) порівняно з групою коліту. Відомо, що ФНП- α відіграє ключову роль в патогенезі ЗЗК [201], опосередковуючи множинні прозапальні сигнали, в тому числі рекрутинг нейтрофілів до місць запалення, активацію коагуляції та фібринолізу, а також індукцію формування гранульоми. ІЛ-10 є ключовим медіатором підтримки гомеостазу в кишечнику, що обмежує і, в кінцевому підсумку, веде до припинення імунних реакцій [203]. Посилення набряку товстої кишки та підвищення рівнів як прозапального ФНП- α , так і протизапального ІЛ-10 під час експериментального коліту після попереднього введення цефтриаксону, вказує на те, що антибіотикотерапія підвищує чутливість до ульцерогенних чинників.

Отже, введення цефтриаксону призводить до віддалених органічних змін інтегративної бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки, що підтверджується: збільшення проникності епітелію товстої кишки щурів, транслокацією бактерій у кров та підвищенням чутливості до розвитку експериментального коліту на 72 добу експерименту (рис. 1).

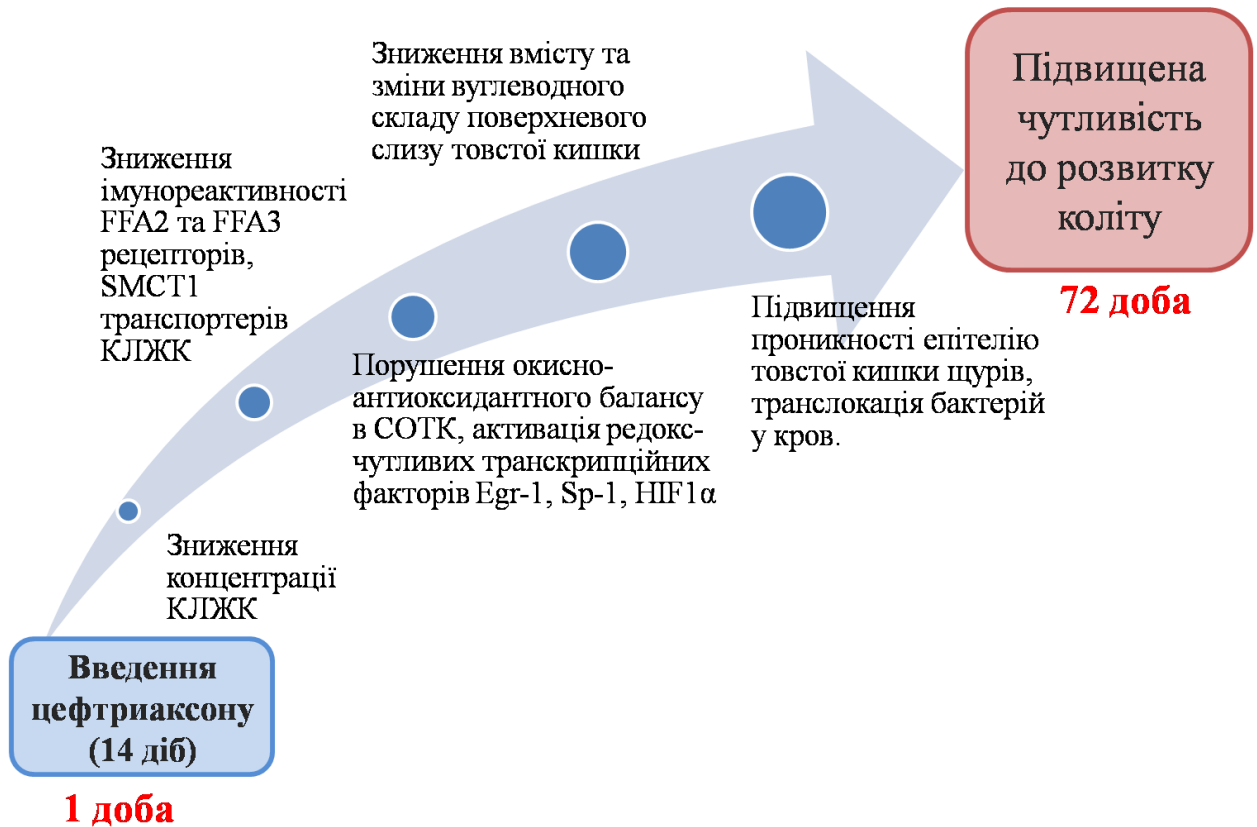


Рис. 1. Схема розвитку віддалених органічних змін інтегративної бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів після введення цефтриаксону.

Таким чином вперше встановлено, що цефтриаксон-викликані зміни концентрації КЛЖК та їх транспортно-рецепторної системи асоціюються з тривалими зрушеннями у окисно-антиоксидантному балансі слизової оболонки товстої кишки, активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, HIF1 α , що призводить до тривалих змін у складі глікопротеїнів слизу і як результат підвищення чутливості кишкового бар'єру до ульцерогенних чинників. Порушення бар'єрної функції товстої кишки є основним фактором віддалених наслідків антибіотикотерапії, що підвищує сприйнятливості до розвитку запалення.

ВИСНОВКИ

Вперше встановлено, що цефтриаксон-викликані зміни вмісту КЛЖК та КЛЖК-специфічних рецепторів і транспортерів супроводжуються тривалими зрушеннями в окисно-антиоксидантному балансі слизової оболонки товстої кишки, активацією редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1, HIF1 α та призводять до тривалих змін у складі глікопротеїнів слизу, і, як результат, підвищення чутливості кишкового бар'єру до ульцерогенних чинників.

1. Показано, що введення цефтриаксону (300 мг/кг, 14 діб) призводило до зниження загального вмісту КЛЖК у дистальному відділі товстої кишки щурів; найбільш суттєво знижувався вміст пропіонової і масляної кислот, що призводило до зростання відносного вмісту оцтової кислоти, яка має прозапальні властивості. Ці зміни були стійкими в часі та супроводжувалися зниженням анаеробного індексу.
2. Встановлено, що введення цефтриаксону щурам впродовж 14 діб зменшувало рівень FFA2 та FFA3 рецепторів у слизовій оболонці товстої кишки; знижувалась імунореактивність SMCT1 транспортера КЛЖК на апікальній мембрані та підвищувалась – MCT1 і MCT4 транспортерів на базолатеральній мембрані ентероцитів.
3. Короткотривале введення цефтриаксону впродовж 5 діб викликало активацію редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1, Sp-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Збільшення терміну введення цефтриаксону до 14 діб асоціювалось з порушенням окисно-антиоксидантного балансу, підвищенням рівня гіпоксія-чутливого транскрипційного фактору HIF1 α , фосфорилування ERK1/2 та пригніченням фосфорилування p38 MAP-кіназ.
4. Зниження загальної концентрації глікопротеїнів, а також гексоз, фукози та підвищення сіалових кислот поверхневого слизу товстої кишки щурів

спостерігалось лише у віддалені терміни після 14-добового введення цефтриаксону (на 72 добу експерименту), що свідчить про передчасне термінування олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнів слизу. Ці зміни супроводжувались посиленням активності прозапальної матриксної металопротеїнази ММП-9 та зниженням антизапальної – ММП-2 в слизовій оболонці товстої кишки щурів.

5. Доведено, що введення цефтриаксону впродовж 14 діб призводить до віддалених змін інтегративної бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки, що підтверджується: збільшенням проникності епітелію товстої кишки щурів, транслокацією бактерій у кров та підвищенням чутливості до розвитку експериментального коліту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Woon S.A. Antimicrobial agents – optimizing the ecological balance / S.A. Woon, D. Fisher // *BMC Med.* – 2016. – Vol. 14. – P. 114.
2. Levy E.R. Rates and appropriateness of antimicrobial prescribing at an academic children's hospital, 2007-2010 / S.Swami, S.G. Dubois, R.Wendt [et al.] // *Infect Control Hosp Epidemiol.* – 2012. – Vol. 33, N 4. – P. 346-353.
3. Дзедман М.І. Проблеми антибактеріальної терапії в Україні та застосування препарату «Аксеф» у комплексному лікуванні неспецифічних запальних захворювань легень / М.І. Дзедман // *Український терапевтичний журнал.* – 2008. – Т. 2. – С. 70-78.
4. Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria / M. Blaser // *Nature.* – 2011. – Vol. 476, N 7361. – P. 393-394.
5. Mårild K. Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case-control study / K. Mårild, W. Ye, B. Lebwoh [et al.] // *BMC Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 13, N 109. – P. 1-9.
6. Horton D.B. Strom antibiotic exposure and juvenile idiopathic arthritis: a case-control study / D.B. Horton, F.I. Scott, K. Haynes [et al.] // *Pediatrics.* – 2015. – Vol. 136, N 2. – P. 333-343.
7. Scott F.I. Administration of antibiotics to children before age 2 years increases risk for childhood obesity / F.I. Scott, D.B. Horton, R. Mamtani [et al.] // *Gastroenterology.* – 2016. Vol. 151, N 1. – P. 120-129.
8. Hviid A. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood / A. Hviid, H. Svanström, M. Frisch // *Gut.* – 2011. Vol. 60, N 1. – P. 49-54.
9. Shaw S.Y. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis / S.Y. Shaw, J.F. Blanchard, C.N. Bernstein // *Am J Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 106, N 12. – P. 2133-2142.

10. 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, N 4. – P. 794–803.
11. Wlodarska M. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis / M. Wlodarska, B. Willing, K. Keeney [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2011. – Vol. 79. – P. 41536-41545.
12. Knoop K.A. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria/ K.A. Knoop, K.G. McDonald, D.H. Kulkarni, R.D. Newberry // *Gut*. – 2016. – Vol. 65, N 7. – P. 1100-1109.
13. Francino M.P. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances / M.P. Francino // *Front Microbiol*. – 2015. – Vol. 6, N 1543. – P. 1-11.
14. Rashid M. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods / M. Rashid, E. Zaura, M.J. Buijs [et al.] // *Clin Infect Dis*. – 2015. – Vol. 60, suppl2. – P. S77-S84.
15. Dethlefsen L. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation / L. Dethlefsen, D.A. Relman // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2011. – Vol. 108, Suppl 1. – P. 4554-4561.
16. Wong J.M. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids / J.M. Wong, R. de Souza, C.W. Kendall [et al.] // *J Clin Gastroenterol*. – 2006. – Vol. 40. – P. 235–243.
17. Brown A.J. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids / A.J. Brown, S.M. Goldsworthy, A.A. Barnes [et al.] // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278, 13. – P. 11312–11319.
18. Le Poul E. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation / E. Le Poul, C.

- Loison, S. Struy [et al.] // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278, N 28. – P. 25481–25489.
19. Nilsson N.E. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids / N.E. Nilsson, K. Kotarsky, C. Owman, B Olde // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 303, N 4. – P. 1047-1052.
20. Thangaraju M. Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer / M. Thangaraju, G. Cresci, S. Itagaki [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2008. – Vol. 12, N 10. – P. 1773-1781.
21. Peng L. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers / L. Peng, Z.R. Li, R.S. Green [et al.] // *J Nutr.* – 2009. - Vol. 139, N 9. – P. 1619-1625.
22. Hatayama H. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T / H. Hatayama, J. Iwashita, A. Kuwajima [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun* – 2007. – Vol. 356, N 3. – P. 599-603.
23. Säemann M.D. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production / M.D. Säemann, G.A. Böhmig, C.H. Osterreicher [et al.] // *FASEB J.* – 2000. – Vol. 14, N 15. – P. 2380-2382.
24. Yin L. Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity / L. Yin, G. Laevsky, C. Giardina // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 48. – P. 44641-44646
25. Høverstad T. Influence of oral intake of seven different antibiotics on faecal short-chain fatty acid excretion in healthy subjects / T. Høverstad, B. Carlstedt-Duke, E. Lingaas [et al.] // *Scand J Gastroenterol.* – 1986. – Vol. 21, N 8. – P. 997-1003.

26. Høverstad T. Influence of ampicillin, clindamycin, and metronidazole on faecal excretion of short-chain fatty acids in healthy subjects / T. Høverstad, B. Carlstedt-Duke, E. Lingaas [et al.] // *Scand J Gastroenterol.* – 1986. – Vol. 21, N 5. – P. 621-626.
27. Gustafsson A Faecal short-chain fatty acids in patients with antibiotic-associated diarrhoea, before and after faecal enema treatment / A. Gustafsson, S. Lund-Tønnesen, A. Berstad [et al.] // *Scand J Gastroenterol.* – 1998. – Vol. 33, N 7. – P. 721-727.
28. Bender A. Colonic fermentation as affected by antibiotics and acidic pH: Application of an in vitro model / A. Bender, G. Breves, J. Stein [et al.] // *Z Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 39, N 11. – P. 911-918.
29. Jakobsson H.E. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome / H.E. Jakobsson, C. Jernberg, A.F. Andersson [et al.] // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5. – P. 310-322.
30. Ширококов В.П., Янковський Д.С., Димент Г.С. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом. Навчальний посібник. – К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2009. – 312 с.
31. Sullivan A. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora / A. Sullivan, C. Edlund, C.E. Nord // *Lancet. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 101–114.
32. Бережной В.В. Нарушения микробной экологии человека: причины и следствия, способы восстановления физиологической нормы / В.В. Бережной, Д.С. Янковский, С.А. Крамарев [и др.] // *Здоровье женщины.* – 2004. – Т. 18, №2. – С. 170-178.
33. Jernberg C. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota / C. Jernberg, S. Lofmark, C. Edlund [et al.] // *ISME J.* – 2007. – Vol. 1, N 1. – P. 56–66.
34. Antonopoulos D.A. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation / Antonopoulos D. A., Huse S.

- M., Morrison H. G. [et al.] // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, N 6. – P. 2367-2375.
35. Sileshi A. Evaluation of ceftriaxone utilization in medical and emergency wards of Tikur Anbessa specialized hospital: a prospective cross-sectional study / A. Sileshi, A. Tenna, M. Feyissa, W. Shibeshi // *BMC Pharmacol Toxicol.* – 2016. – Vol. 17. – P. e1-7.
36. Beam T.R. Ceftriaxone: a beta-lactamase-stable, broad-spectrum cephalosporin with an extended half-life / T.R. Beam // *Pharmacotherapy.* – 1985. – Vol. 5. – P. 237–253.
37. Ratti E. Preclinical rodent toxicity studies for long term use of ceftriaxone / E. Ratti, J.D. Berry, D.J. Greenblatt [et al.] // *Toxicol Rep.* – 2015. – Vol. 2. – P. 1396–1403.
38. Сидоренко С.В. Клиническая и фармакоэкономическая эффективность цефтриаксона у хирургических больных / С.В. Сидоренко, Е.А. Ушкалова // *Фарматека.* – 2003. – Т. 64, №1. – С. 11-25.
39. Rafii F. Effects of treatment with antimicrobial agents on the human colonic microflora / F. Rafii, J.B. Sutherland, C.E. Cerniglia // *Ther. Clin. Risk Manag.* – 2008. – Vol. 4. – P. 1343–1358.
40. Welling G.W. The effect of ceftriaxone on the anaerobic bacterial flora and the bacterial enzymatic activity in the intestinal tract / G.W. Welling, G.J. Meijer-Severs, G. Helmus [et al.] // *Infection.* – 1991. – Vol. 19, N 5. – P. 313-316.
41. Guo Y. Long-term use of ceftriaxone sodium induced changes in gut microbiota and immune system / Y. Guo, X. Yang, Y. Qi [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 43035.
42. Luo X. Effects of ceftriaxone induced intestinal dysbacteriosis on lymphocytes in different tissues in mice / X. Luo, Y. Zheng, R. Wen [et al.] // *Immunobiology.* – 2016. – Vol. 221, N 9. – P. 994-1000.

43. 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, N 8. – P. 561-568.
44. van Nuenen M.H. The metabolic activity of fecal microbiota from healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease / M.H. van Nuenen, K. Venema, J.C. van der Woude, E.J. Kuipers // *Dig Dis Sci.* – 2004. – Vol. 49, N 3. – P. 485-491.
45. den Besten G. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism / G. den Besten, K. van Eunen, A.K. Groen [et al.] // *J Lipid Res.* – 2013. – Vol. 54, N 9. – P. 2325-2340.
46. Topping D.L. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides / D.L. Topping, P.M. Clifton // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1031–1064
47. Donohoe D.R. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon / D.R. Donohoe, N. Garge, X. Zhang, [et al.] // *Cell Metab.* – 2011. – Vol. 13, N 5. – P. 517-526.
48. Jenkins D.J. Specific types of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations / D.J. Jenkins, T.M. Wolever, A. Jenkins [et al.] // *Am J Clin Nutr.* – 1991. Vol. 54. – P. 141-147.
49. Bush R.S. Study of the mechanism of inhibition of ketogenesis by propionate in bovine liver / R.S. Bush, L.P. Milligan // *Can J Anim Sci.* – 1971. – Vol. 51. – P. 121-127.
50. Thornton J.R. High colonic pH promotes colorectal cancer / J.R. Thornton // *Lancet.* – 1981. – Vol. 8229, N 1. – P. 1081-1083.
51. Tedelind S. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease / S. Tedelind, F. Westberg, M. Kjerrulf, A. Vidal. - *World J Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13, N 20. – P. 2826-2832.

52. Vinolo M.A. Regulation of inflammation by short chain fatty acids / M.A. Vinolo, H.G. Rodrigues, R.T. Nachbar, R. Curi // *Nutrients*. – 2011. – Vol. 3, N 10. – P. 858–876.
53. Maslowski K.M. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 / K.M. Maslowski, A.T. Vieira, A. Ng // *Nature*. – 2009. – Vol. 461, N 7268. – P. 1282-1286.
54. Chai F Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate / F. Chai, A. Evdokiou, G.P. Young [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21, N 1. – P. 7-14.
55. Schilderink R., Verseijden C., de Jonge W.J. Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis // *Front Immunol*. – 2013. – Vol. 4. – P. 226.
56. Burger-van Paassen N. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection / N. Burger-van Paassen, A Vincent, P.J. Puiman [et al.] // *Biochem J*. – 2009. – Vol. 420, N 2. – P. 211-219.
57. Jung T.H. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway / T.H. Jung, J.H. Park, W.M. Jeon, K.S. Han // *Nutr Res Pract*. – 2015. – Vol. 9, N 4. – P. 343-349.
58. Roediger W.E. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? / W.E. Roediger // *Lancet*. – 1980. – Vol. 2. – P. 712-715.
59. Marchesi, J.R. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease / J.R. Marchesi, E. Holmes, F. Khan, [et al.] // *J Proteome Res*. – 2007. – Vol. 6, N 2. – P. 546-551.
60. Huda-Faujan N. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects / N. Huda-Faujan, A.S. Abdulmir, A.B. Fatimah [et al.] // *Open Biochem J*. – 2010. Vol. 4. – P. 53–58.

61. Harig J.M. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation / J.M. Harig, K.H. Soergel, R.A. Komorowski [et al.] // *N Engl J Med.* – 1989. – Vol. 320, N 1. – P. 23-28.
62. Guillemot F. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study/ F. Guillemot, J.F. Colombel, C. Neut [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 1991. – Vol. 34, N 10. – P. 861-864.
63. Roediger W.E. Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes: a biochemical basis for ulcerative colitis? / W.E. Roediger, A. Duncan, O. Kapaniris [et al.] // *Clin Sci (London).* – 1993. – Vol. 85, N 5. – P. 623-627.
64. Sabatino A.D. Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease / A.D. Sabatino, R. Morera, R. Ciccocioppo [et al.] // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2005. – Vol. 22, N 9. – P. 789-794.
65. Vieira E.L. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis / E.L. Vieira, A.J. Leonel, A.P. Sad [et al.] // *J Nutr Biochem.* – 2012. – Vol. 23, N 5. – P. 430-436.
66. Iwanaga T. Cellular distributions of monocarboxylate transporters: a review / T. Iwanaga, A. Kishimoto // *Biomed Res.* – 2015. – Vol. 36, N 5. – P. 279-301.
67. Halestrap A.P. Monocarboxylic acid transport / A.P. Halestrap // *Compr Physiol.* – 2013. – Vol. 3, N 4. – P. 1611-1643.
68. Kirat D. Dietary pectin up-regulates monocarboxylate transporter 1 in the rat gastrointestinal tract / D. Kirat, K. Kondo, R. Shimada, S. Kato // *Exp Physiol.* – 2009. – Vol. 94, N 4. – P. 422-433.
69. Srinivas S.R. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2) / S.R. Srinivas, E. Gopal, L. Zhuang // *Biochem J.* – 2005. – Vol. 392. – P. 655–664.
70. Stoddart L.A. Conserved polar residues in transmembrane domains V, VI, and VII of free fatty acid receptor 2 and free fatty acid receptor 3 are required for the binding and function of short chain fatty acids / L.A. Stoddart, N.J. Smith,

- L. Jenkins [et al.] // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283, N 47. – P. 32913-32924.
71. Milligan G. Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3 / G. Milligan, L.A. Stoddart, N.J. Smith // *Br J Pharmacol.* – 2009. – Vol. 158, N 1. – P. 146-153.
72. Lee S.U. β -Arrestin 2 mediates G protein-coupled receptor 43 signals tonuclear factor- κ B / S.U. Lee, H.J. In, M.S. Kwon [et al.] // *Biol Pharm Bull.* – 2013. – Vol. 36, N 11. – P. 1754-1759.
73. Nøhr M.K. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes / M.K. Nøhr, M.H. Pedersen, A. Gille [et al.] // *Endocrinology.* – 2013. – Vol. 154, N 10. – P. 3552-3564.
74. Tolhurst G. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2 / G. Tolhurst, H. Heffron, Y.S. Lam // *Diabetes.* – 2012. – Vol. 61, N 2. – P. 364-371.
75. Akiba Y. Short-chain fatty acid sensing in rat duodenum / Y. Akiba, T. Inoue, I. Kaji [et al.] // *J Physiol.* – 2015. – Vol. 593, N 3. – P. 585-599.
76. Lin H.V. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms / H.V. Lin, A. Frassetto, E.J. Kowalik [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 4. – P. e35240.
77. Sina C. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation / C. Sina, O. Gavrilova, M. Förster [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 11. – P. 7514-7522.
78. Smith P.M. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis / P.M. Smith, M.R. Howitt, N. Panikov [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 341, N 6145. – P. 569-573.
79. Kim M.H. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice / M.H. Kim,

- S.G.Kang, J.H. Park [et al.] // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145, N 2. – P. 396-406.
80. Vinolo M.A. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils / M.A. Vinolo, E. Hatanaka, R.H. Lambertucci [et al.] // *Cell Biochem Funct*. – 2009. – Vol. 27, N 1. – P. 48-55.
81. Vieira A.T. A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout / A.T. Vieira, L. Macia, I. Galvão [et al.] // *Arthritis Rheumatol*. – 2015. – Vol. 67, N 6. – P. 1646-1656.
82. Priyadarshini M. An acetate-specific GPCR, FFAR2, regulates insulin secretion / M. Priyadarshini, S.R. Villa, M. Fuller [et al.] // *Mol Endocrinol*. – 2015. – Vol. 29, N 7. – P. 1055-1066.
83. Ge H. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids / H. Ge, X. Li, J. Weizmann [et al.] // *Endocrinology*. – 2008. – Vol. 149, N 9. – P. 4519-4526.
84. Nøhr M.K. Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia / M.K. Nøhr, K.L. Egerod, S.H. Christiansen // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 290. – P. 126-137.
85. McGuckin M.A. Mucin dynamics and enteric pathogens / M.A. McGuckin, S.K. Lindén, P. Sutton, T.H. Florin // *Nat. Rev. Microbiol*. – 2011. – Vol. 9, N 4. – P. 265-278.
86. Viggiano D. Gut barrier in health and disease: focus on childhood / D. Viggiano, G. Ianaro, G. Vanella [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. – 2015. – Vol. 19, N 6. – P. 1077-1085.
87. Johansson M.E. The two mucin layers of colon are organized by the muc2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions / M.E. Johansson, J.M. Larsson, G.C. Hansson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108 (Suppl. 1). – P. 4659–4665.
88. Larsson J.M. A complex, but uniform *O*-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn / J.M. Larsson, H.

- Karlsson, H. Sjövall, G.C. Hansson // *Glycobiology*. – 2009. – Vol. 19, N 7. – P. 756–766.
89. Karlsson N.G. The glycosylation of rat intestinal Muc2 mucin varies between rat strains and the small and large intestine. A study of O-linked oligosaccharides by a mass spectrometric approach / N.G. Karlsson, A. Herrmann, H. Karlsson [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, N 43. – P. 27025-27034.
90. An G. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans / G. An, B. Wei, B. Xia [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204, N 6. – P. 1417–1429.
91. Fu J. Loss of intestinal core1-derived O-glycans causes spontaneous colitis / J. Fu, B. Wei, T. Wen, M.E. Johansson // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, N 4. – P. 1657–1666.
92. Corfield A.P. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria / A.P. Corfield, S.A. Wagner, J.R. Clamp // *Infect. Immun.* – 1992. – Vol. 60, N 10. – P. 3971–3978.
93. Shirazi T. Mucins and inflammatory bowel disease / T. Shirazi, R.J. Longman, A.P. Corfield [et al.] // *Postgrad. Med. J.* – 2000. – Vol. 76. – P. 473–478.
94. Sun J. Therapeutic potential to modify the mucus barrier in inflammatory bowel disease / J. Sun, X. Shen, Y. Li [et al.] // *Nutrients*. – 2016. – Vol. 8, N 1. – P. 44.
95. Johansson M.E. The gastrointestinal mucus system in health and disease / M.E. Johansson, H. Sjövall, G.C. Hansson [et al.] // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. – Vol. 10, N 6. – P. 352–361.
96. Sluis V. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection / M.V. der Sluis, B.A. Koning, A.C. Bruijn [et al.] // *Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 131, N 1. – P. 117-129.

97. Johansson M.E. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis / M.E. Johansson, J.K. Gustafsson, J. Holmén-Larsson [et al.] // *Gut*. – 2014. – Vol. 63, N 2. – P. 281-291.
98. Luissint A.C. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair / A.C. Luissint, C.A. Parkos, A. Nusrat [et al.] // *Gastroenterology*. – 2016. – Vol. 151, N 4. – P. 616-632.
99. Martin H.M. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent / H.M. Martin, J.T. Hancock, V. Salisbury [et al.] // *Infect Immun* – 2004. – Vol. 72. – P. 4933–4939.
100. Bhattacharyya A. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay, S. Mitra [et al.] // *Physiol Rev*. – 2014. – Vol. 94, N 2. P. 329-354.
101. Balmus I.M. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in inflammatory bowel disease: clinical aspects and animal models / I. M. Balmus, A. Ciobica, A. Trifan [et al.] // *Saudi J Gastroenterol*. – 2016. – Vol. 22, N 1. P. 3–17.
102. Moura F.A. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? / F.A. Moura, K.Q. de Andrade, J.C. Santos [et al.] // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 617-639.
103. Kruidenier L. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants / L. Kruidenier, I. Kuiper, C.B. Lamers [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2003. – Vol. 201, N 1. – P. 28-36.
104. Campbell E.L. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation / E.L. Campbell, W.J. Bruyninckx, C.J. Kelly [et al.] // *Immunity*. – 2014. Vol. 40, N 1. – P. 66-77.

105. Rao R.K. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation / R.K. Rao, R.D. Baker, S.S. Baker [et al.] // *Am J Physiol.* – 1997. – Vol. 273, N 4. P. G812-23.
106. Dixit P. Differential effect of oxidative stress on intestinal apparent permeability of drugs transported by paracellular and transcellular route / P. Dixit, D.K. Jain, J.S. Rajpoot // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* – 2012. – Vol. 37, N 3. – P. 203-209.
107. Tian R. The role of intestinal mucosa oxidative stress in gut barrier dysfunction of severe acute pancreatitis / R. Tian, J.T. Tan, R.L. Wang [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2013. – Vol. 17, N 3. – P. 349-355.
108. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // *Physiol Rev.* – 2002. – Vol. 82, N 1. – P. 47-95.
109. Biswas S. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling / S. Biswas, A.S. Chida, I. Rahman // *Biochem Pharmacol.* – 2006. – Vol. 71, N 5. – P. 551-564.
110. Толстанова Г. М. Зміни транскрипційної активності Редокс-чутливого фактору росту ранньої відповіді (EGR-1) в патогенезі запальних захворювань кишечника / Г. М. Толстанова // *Вісник проблем біології і медицини.* - 2010. - Вип. 3. - С. 66-71
111. Tonks N.K. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling / N.K. Tonks // *Cell.* – 2005. – Vol. 121, N 5. – P. 667-670.
112. Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling / M. Torres // *Front Biosci.* – 2003. – Vol. 8. – P. d369-391.
113. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. д-ра биол. наук. – Москва, 2003. – 45 с.
114. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лабораторное дело.* – 1988. – Вып. 1. – С. 16-18

115. Bertrand R. Modifying polyacrylamide background color for the nitroblue tetrazolium-based superoxide dismutase staining assay / R. Bertrand, M. Eze // *Advances in Enzyme Research*. – 2014. – Vol.2, N2. – P. 77-81.
116. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — P. 66–68.
117. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1959. – Vol. 82, N 1. – P. 70-77.
118. Komuro Y. A new method of separation and quantitation of mucus glycoprotein in rat gastric mucus gel layer and its application to mucus secretion induced by 16,16-dimethyl PGE₂ / Y. Komuro, K. Ishihara, S. Ohara [et al.] // *Gastroenterol Jpn.* – 1991. – Vol. 26, N 5. – P. 582-587.
119. 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. – P. 437–447.
120. Романенко Е.Г. Способ определения общих гликопротеинов в слюне / Е.Г. Романенко, И.А. Кленина // *Світ медицини та біології*. – 2012. – Vol. 4. – P. 91-93.
121. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Минск, Беларусь, 1976. – P. 380 с.
122. Dishe Z. A specific colour reaction of methylpentosis and spectrophotometric reaction for their determination / Z. Dishe, H. Shettles // *J. Biol. Chem.* – 1948. – Vol. 175, N 7. – P. 595- 603.
123. Романенко Е.Г. Метод определения гексозаминов в слюне / Е.Г. Романенко, И.А. Кленина // *Вісник пробл. біол. і мед.* – 2013. – Vol. 2, N1. – P. 215-217.
124. Toth M. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography / M. Toth, R. Fridman // *Methods Mol Med.* - 2001. - Vol. 57. - P. 163-173.
125. Афіцька А.І. Метод вимірювання проникності епітелію товстої кишки щурів у різні терміни експериментального коліту / А.І. Афіцька,

- Т.В.Довбинчук, Ю.В.Голота [та ін.] // Клініч. та експерим. патологія. – 2015. Т. 14, № 4. – С. 9-13.
- 126.Larauche M. Cotragine, a CRF₁ agonist, induces stress like alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways / M.Larauche, G. Gourcerol, L.Wang [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2009. Vol. 297. – P. 215–227.
- 127.Satoh H.New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis / H. Satoh, F. Sato, K. Takami, [et al.] // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 73. – P. 299-309.
- 128.Mathewson N.D. Gut microbiome derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate Graft-versus-Host Disease /N.D.Mathewson, R. Jenq, A.V.Mathew [et al.] // *Nat. Immunol.*– 2016. – Vol. 17, N 5. – P. 505–513.
- 129.Vogt S.L.Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens /S.L. Vogt, J.Peña-Díaz, B.B.Finlay // *Anaerobe.*– 2015. – Vol. 34. – P. 106-115.
- 130.Lee W.J.Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease /W.J.Lee, K. Hase // *Nat. Chem. Biol.* – 2014. Vol. 10, N 6. – P. 416-424.
- 131.Xiao J.Gut function-enhancing properties and metabolic effects of dietary indigestible sugars in rodents and rabbits /J.Xiao, B.U.Metzler-Zebeli, Q.Zebeli // *Nutrients.*– 2015. – Vol. 7, N 10. – P. 8348–8365.
- 132.Ардатская М.Д.Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции / М.Д.Ардатская, О.Н. Минушкин // *Гастроэнтерология, прилож. к журн. Consilium Medicum.*– 2006. – Т. 8, № 2. –С. 4-17.
- 133.Meijer-Severs G.J.Short-chain fatty acid and organic acid concentrations in feces of healthy human volunteers and their correlations with anaerobe cultural counts during systemic ceftriaxone administration /G.J. Meijer-Severs, E. Van Santen, B.C. Meijer // *Scand J Gastroenterol.* – 1990. – Vol. 25, N 7. – P. 698-704.

134. Tulstrup M.V. Antibiotic treatment affects intestinal permeability and gut microbial composition in Wistar rats dependent on antibiotic class/ M.V.Tulstrup, E.G.Christensen, V.Carvalho [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 12. – P. 1-17.
135. Loesche W.J. Effect of bacterial contamination on cecal size and cecal contents of gnotobiotic rodents / W.J. Loesche // J. Bacteriol.– 1969. – Vol. 99, N 2. – P. 520-526.
136. K. Machiels, M. Joossens, J. Sabino A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis / K.Machiels, M.Joossens, J.Sabino [et al.] // Gut.– 2014. Vol. 63, N 8. – P. 1275-1283.
137. Antharam V. C. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea / V.C.Antharam, E.C.Li, A. Ishmael [et al.] // J. Clin. Microbiol.– 2013. – Vol. 51, N 9. – P. 2884–2892.
138. Chen H.M. Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma /H.M.Chen, Y.N.Yu, J.L. Wang [et al.] // Am. J. Clin. Nutr.– 2013. – Vol. 97, N 5. – P. 1044-1052.
139. Lin H.V. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms /H.V.Lin, A.Frassetto, E.J. Kowalik [et al.] // PLoS One.– 2012. – Vol. 7, N 4. – P. e35240.
140. Kendrick S.F. Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis / S.F. Kendrick, G.O'Boyle, J.Mann [et al.] // Hepatology.– 2010. – Vol. 51, N 6. – P. 1988-1997.
141. Kim C.H. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids, t cells, and inflammation/ C.H.Kim, J. Park, M. Kim // Immune Network. – 2014. – Vol. 14, N 6. – P. 277-288.

142. Ganapathy V. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer / V. Ganapathy, M. Thangaraju, E. Gopal [et al.] // *AAPS J.* – 2008. – Vol. 10. – P. 193–199.
143. Thibault R. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency / R. Thibault, F. Blachier, B. Darcy-Vrillon // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2010. – Vol. 16, N 4. – P. 684–695.
144. Iwanaga T. Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to *slc5a8* / T. Iwanaga, K. Takebe, I. Kato [et al.] // *Biomed. Res.* – 2006. – Vol. 27, N 5. – P. 243–254.
145. Cresci G.A. Colonic gene expression in conventional and germ-free mice with a focus on the butyrate receptor GPR109A and the butyrate transporter SLC5A8 / G.A. Cresci, M. Thangaraju, J.D. Mellinger [et al.] // *J Gastrointest Surg.* – 2010. – Vol. 14, N 3. – P. 449–461.
146. Coady M.J. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter / M.J. Coady, M.H. Chang, F.M. Charron [et al.] // *J. Physiol.* – 2004. – Vol. 557, N 3. – P. 719–731.
147. Gopal E. Sodium-coupled and electrogenic transport of B-complex vitamin nicotinic acid by *slc5a8*, a member of the Na⁺/glucose cotransporter gene family / E. Gopal, Y.J. Fei, S. Miyauchi [et al.] // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 388 (Pt 1). – P. 309–316.
148. Tang Y. G protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer / Y. Tang, Y. Chen, H. Jiang [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 128, N 4. – P. 847–56.
149. Tazoe H. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon / H. Tazoe, Y. Otomo, S. Karaki [et al.] // *Biomed Res.* – 2009. – Vol. 30, N 3. – P. 149–156.
150. Kimura I. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41) / I. Kimura,

- D.Inoue, T. Maeda [et al.] //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – Vol. 108, N 19. – P. 8030–8035.
- 151.Cagin Y.F.Effects of dexpanthenol on acetic acid-induced colitis in rats /Y.F. Cagin, H. Parlakpınar, N. Vardi [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2016. – Vol. 12, N 5. – P. 2958–2964.
- 152.Yoshikawa T. Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats / T. Yoshikawa, S. Ueda, Y. Naito [et al.] // Free Radic. Res. Commun. – 1989. – Vol. 7, N 3-6. – P. 285-291.
- 153.Achitei D.Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients /D. Achitei, A. Ciobica, G. Balan [et al.] //Dig. Dis. Sci. – 2013. – Vol. 58, N 5. – P. 1244-1249.
- 154.Kruidenier L. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization and association with mucosal antioxidants / L. Kruidenier, I. Kuiper, C.B. Lamers [et al.] // J. Pathol. – 2003. Vol. 201, N 1. – P. 28-36.
- 155.Фоменко І.С. Роль процесів ліпопероксидації у формуванні виразкових ушкоджень слизової оболонки товстої кишки щурів при різних моделях стресу / І.С. Фоменко // Вісник проблем біології та медицини. – 2015. – Т. 1(122), №3. – С. 223-226.
- 156.Harty R.F. Energy, oxidative stress, and inflammation in the colon / R.F. Harty // Digestive Diseases and Sciences. – 2013. – Vol. 58. – P. 3386–3388.
- 157.Khan R. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats / R. Khan, S. Sultana Chem // Chemico-Biological Interactions. – 2011. – Vol. 192, N 3. – P. 193-200.
- 158.Marinho H.S.Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors / H.S. Marinho, C. Real, L. Cyrne [et al.] // Redox Biol. – 2014. – N 2. – P. 535-562.

159. Ryu H. Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons / H. Ryu, J. Lee, K. Zaman [et al.] // *J Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, N 9. – P. 3597-3606.
160. Pagel J.I. Disease progression mediated by Egr-1 associated signaling in response to oxidative stress / J.I. Pagel, E. Deindl // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, N 10. – P. 13104-13117.
161. Zhang X. Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1 / X. Zhang, Y. Liu // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – 284, N 6. – P. 1216-1225.
162. Г.М. Толстанова, Л.І. Остапченко. Взаємодія транскрипційних факторів Egr-1 та Sp 1 в патогенезі запальних захворювань кишечника // *Медична хімія.* – 2010. – С. 23-27.
163. Толстанова Г.М. Зміни транскрипційної активності редокс-чутливого фактору росту ранньої відповіді (Egr-1) в патогенезі запальних захворювань кишечника / Г.М. Толстанова // *Вісник проблем біології і медицини.* — 2010. — №. 3. — С. 66-71.
164. Khomenko T. Suppression of early growth response factor-1 with egr-1 antisense oligodeoxynucleotide aggravates experimental duodenal ulcers. / T. Khomenko, S. Szabo, X. Deng [et al.] // *American J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* — 2006. — Vol. 290, No. 6. — P. G1211–G1218.
165. Vizcaino C. Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy / C. Vizcaino, S. Mansilla, J. Portugal // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – Vol. 152. – P. 111-124.
166. Kelly C.J. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function / C.J. Kelly, L. Zheng, E.L. Campbell // *Cell Host Microbe.* – 2015. – Vol. 17, N 5. – P. 662-671.
167. Chen C.A. Extracellular signal-regulated kinase plays a proapoptotic role in podocytes after reactive oxygen species treatment and inhibition of integrin-

- extracellular matrix interaction /C.A. Chen,T.S.Chen,H.C.Chen //Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2012. – Vol. 237. – P. 777–783.
- 168.Chang L.Mammalian MAP kinase signalling cascades / L. Chang, M.Karin // Nature. – 2001. – Vol. 410, N 6824. – P. 37-40.
- 169.Cuenda A.p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases /A.Cuenda, S. Rousseau //Biochim. Biophys. Acta. –2007. N 1773. – P. 1358–1375.
- 170.Otsuka M. Distinct effects of p38alpha deletion in myeloid lineage and gut epithelia in mouse models of inflammatory bowel disease /M.Otsuka, Y.J. Kang, J. Ren[et al.] // Gastroenterology. – 2010. – Vol. 138, N 4. – P. 1255-1265.
- 171.Gupta J.Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival / J. Gupta, I. del Barco Barrantes, A. Igea [et al.] // Cancer Cell. – 2014. – Vol. 25, N 4. – P. 484-500.
- 172.McGuckin M.A.Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases /M.A.McGuckin, R.Eri, L.A.Simms [et al.] //Inflamm. Bowel. Dis.– 2009. – Vol. 15, N 1. – P. 100–113.
- 173.Campbell B.J. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: A possible role in cancer development / B.J.Campbell, L.G.Yu, J.M.Rhodes // Glycoconjugate J.– 2001. – Vol. 18, N 11-12. – P. 851–858.
- 174.Campbell B.J. Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin /B.J. Campbell, I.A. Finnie, E.F. Hounsell [et al.] // J. Clin. Invest.– 1995. – Vol. 95, N 2. – P. 571-576.
- 175.Okada Y. Fucosylated Thomsen-Friedenreich antigen in a-anomeric configuration in human gastric surface epithelia: an allogenic carbohydrate antigen possibly controlled by the Se gene / Y. Okada, M.-A. Sotozono, N. Sakai, [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 1994. – Vol. 42. – P. 371-376.

176. Karlen P. Sialyl-Tn antigen as a marker of colon cancer risk in ulcerative colitis: Relation to dysplasia and DNA aneuploidy / P.Karlen, E.Young, O.Brostrom [et al.] // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 115, N 6. – P. 1395–1404.
177. Ley K. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated /K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.*–2007. – Vol. 7, N 9. – P. 678–689.
178. Herszényi L. Proteases in gastrointestinal neoplastic disease /L. Herszényi, M. Plebani, P. Carraro [et al.] // *Clin. Chimica. Acta.* – 2000. – Vol. 291, N 2. – P. 171–187.
179. Koelink P.J. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease /P.J. Koelink, S.A. Overbeek, S. Braber [et al.] // *Gut*. – 2014. – Vol. 63, N 4. – P. 578–587.
180. Stallmach A. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis / A. Stallmach, C.C. Chan, K.W. Ecker [et al.] // *Gut*. –2000. – Vol. 47, N 3. – P. 415–422.
181. von Lampe B. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease /B.von Lampe, B. Barthel, S.E. Coupland [et al.] // *Gut*. – 2000. – Vol. 47, N 1. – P. 63–73.
182. Castaneda F.E. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP / F.E. Castaneda, B. Walia, M. Vijay-Kumar [et al.] // *Gastroenterology*. –2005. – Vol. 129, N 6. – P. 1991–2008.
183. Liu H. Constitutive expression of MMP9 in intestinal epithelium worsens murine acute colitis and is associated with increased levels of proinflammatory cytokine Kc /H. Liu, N.R. Patel, L. Walter [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2013. – Vol. 304, N 9. – P. G793-803.
184. Garg P. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis /P.Garg, M.

- Vijay-Kumar, L. Wang [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2009. – Vol. 296, N 2. – P. G175-184.
185. Garg P. Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis / P. Garg, A. Ravi, K. Bockbrader [et al.] // *J. Immunol.* 2006. – Vol. 177, N 6. – P. 4103–4112.
186. Balzan S. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact / S. Balzan, C. de Almeida Quadros, R. de Cleve [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – Vol. 22, N 4. – P. 464-471.
187. Nikkari S. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? / S. Nikkari, I. J. McLaughlin, W. Bi [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39, N 5. – P. 1956-1959.
188. Дьяченко А.Г. Мукозний імунітет і транслокація бактерій / А.Г. Дьяченко, К.М. Горобченко // *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія.* – 2016. – Т. 97, № 8. – С. 10-16.
189. MacFie J. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity / J. MacFie, C. O'Boyle, C. Mitchell [et al.] // *Gut.* – 1999. – Vol. 45, N 2. – P. 223–228.
190. Potgieter M. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases / M. Potgieter, J. Bester, D. B. Kell [et al.] // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2015. – Vol. 39, N 4. – P. 567-591.
191. de Jong P. R. The digestive tract as the origin of systemic inflammation / P. R. de Jong, J. M. González-Navajas, N. J. Jansen // *Crit. Care.* – 2016. – Vol. 20, N 1. – P. 279.
192. Kaser A. Inflammatory bowel disease / A. Kaser, S. Zeissig, R. S. Blumberg // *Annu. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 573-621.
193. Wierzbicki M. The role of mast cells in the development of inflammatory bowel diseases / M. Wierzbicki, E. Brzezińska-Błaszczyk // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2008. – Vol. 62. – P. 642-650.

194. Hashash J.G. Patterns of Antibiotic Exposure and Clinical Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease: A 4-year Prospective Study / J.G. Hashash, P. Chintamaneni, C.M. Ramos Rivers [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2015. – Vol. 21, N 11. – P. 2576-2582.
195. Leedham S.J. Intestinal stem cells / S.J. Leedham, M. Brittan, S.A. McDonald [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2005. Vol. 9, N 1. – P. 11-24.
196. Ott S.J. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease / S.J. Ott, M. Musfeldt, D.F. Wenderoth [et al.] // *Gut.* – 2004. – Vol. 53. – P. 685–693.
197. Devkota S. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in $Il10^{-/-}$ mice / S. Devkota, Y. Wang, M.W. Musch [et al.] // *Nature.* – 2012. – Vol. 7405, N 487. – P. 104–108.
198. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases / R.B. Sartor // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 134, N 2. – P. 577-594.
199. Wu H.J. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity / H.J. Wu, E. Wu // *Gut Microbes.* – 2012. – Vol. 3, N 1. – P. 4–14.
200. Okumura R. Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system / R. Okumura, K. Takeda // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* – 2016. – Vol. 92, N 9. – P. 423-435.
201. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease / J.R. Bradley // *J. Pathol.* – 2008. – Vol. 214, N 2. – P. 149-160.
202. Magro F. Management of inflammatory bowel disease with infliximab and other anti-tumor necrosis factor alpha therapies / F. Magro, F. Portela // *Bio. Drugs.* – 2010. – Vol. 24, Suppl 1. – P. 3-14.
203. Paul G. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10 / G. Paul, V. Khare, C. Gasche // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 42, N 1. – P. 95-109.

204. Kühn R. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis / R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick [et al.] // *Cell*. – 1993. – Vol. 75, N 2. – P. 263-274.
205. Keubler L.M. A multihit model: colitis lessons from the interleukin-10-deficient mouse / L.M. Keubler, M. Buettner, C. Häger [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2015. – Vol. 21, N 8. – P. 1967–1975.
206. Donaldson G.P. Gut biogeography of the bacterial microbiota / G.P. Donaldson, L.S. Melanie, S.K. Mazmanian // *Nature Reviews Microbiology*. – 2016. – Vol. 14. – P. 20–32.
207. 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, N 5728. – P. 1635-1638.
208. Kelder T. Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health / T. Kelder, J.H. Stroeve, S. Bijlsma [et al.] // *Nutr. Diabetes*. – 2014. – Vol. 4, N 6. – P. e122.
209. Ward N.L. Antibiotic treatment induces long-lasting changes in the fecal microbiota that protect against colitis / N.L. Ward, C.D. Phillips, D.D. Nguyen [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2016. – Vol. 22, N 10. – P. 2328-2340.
210. Rapozo D.C. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony / D.C. Rapozo, C. Bernardazzi, H. de Souza // *World J Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23, N 12. – P. 2124-2140.
211. Kostic A.D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead / A.D. Kostic, R.J. Xavier, D. Gevers // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 146, N 6. – P. 1489-1499.
212. Hudson B.D. Extracellular ionic locks determine variation in constitutive activity and ligand potency between species orthologs of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3 / B.D. Hudson, I.G. Tikhonova, S.K. Pandey [et al.] // *J Biol Chem*. – 2012. – Vol. 287, N 49. – P. 41195-209.

213. Ordas I. Ulcerative colitis / I. Ordas, L. Eckmann, M. Talamini [et al.]
//Lancet. – 2012. – Vol. 380, N 9853. – P. 1606–1619.