

Г. М. Толстанова, Л. В. Закордонець, О. В. Жолос,
Т. М. Сергійчук, Т. В. Довбинчук, Ю. В. Голота,
С. О. Крамарев, Д. С. Янковський

**ПРОБІОТИКИ НА ВАРТІ
ПОРУШЕНЬ РОБОТИ КИШЕЧНИКА,
СПРИЧИНЕНИХ ЗАСТОСУВАННЯМ
АНТИБІОТИКІВ**

Монографія

Львів
Видавець Марченко Т. В.
2020

УДК 612.3

П26

Рекомендовано до друку на засіданні Вченої Ради Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 3 від 10 листопада 2020 року.

АВТОРСЬКИЙ КОЛЕКТИВ:

- Толстанова Ганна Миколаївна** – доктор біологічних наук, професор, лауреат державної премії в галузії науки і техніки. Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка
- Закордонець Людмила Владиславівна** – кандидат медичних наук. Кафедра дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О. О. Богомольця
- Жолос Олександр Вікторович** – доктор біологічних наук, професор. Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
- Сергійчук Тетяна Михайлівна** – кандидат біологічних наук, доцент. Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
- Довбинчук Таїсія Володимирівна** – кандидат біологічних наук. Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
- Голота Юлія Володимирівна** – кандидат біологічних наук. Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
- Крамарев Сергій Олександрович** – доктор медичних наук, професор, заслужений лікар України. Кафедра дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О. О. Богомольця
- Янковський Дмитро Станіславович** – доктор біологічних наук, професор, генеральний директор ТОВ «Фірма «О. Д. Пролісок»

Пробіотики на варті порушень роботи кишечника, спричинених застосуванням антибіотиків : Монографія / Г. М. Толстанова, Л. В. Закордонець, О. В. Жолос та ін. – Львів : Видавець Марченко Т. В., 2020. – 160 с.

ISBN 978-617-7937-36-3

У монографії висвітлені результати досліджень, проведених впродовж останніх десяти років колективом авторів за кошти гранту Президента України для обдарованої молоді № 12/2011; МОН України на виконання проектів № держреєстрації: 0111U004648, 2011–2015 рр.; д/р 0116U002527, 2016–2018 рр.; 0119U100307, 2019–2021 рр.; гранту від Національного фонду досліджень України за конкурсним проектом 2020.02/0147

УДК 612.3

© Г. М. Толстанова, Л. В. Закордонець,
О. В. Жолос та ін., 2020

© Видавець Марченко Т. В., 2020

ISBN 978-617-7937-36-3

ЗМІСТ

Розділ 1. ПРОБІОТИКИ НА ВАРТІ АНТИБІОТИКОАСОЦІЙОВАНОЇ ДІАРЕЇ (Толстанова Г.М., Довбинчук Т.В., Закордонець Л.В., Крамарев С.О.)	5
1.1. Епідеміологія та етіопатогенез антибіотикоасоційованої діареї	5
1.2. Транспортна функція епітелію товстої кишки в механізмах розвитку антибіотикоасоційованих діарей	9
1.3. Механізми, що лежать в основі транзиторної антибіотикоасоційованої діареї за дії антибіотика цефалоспоринового ряду цефтріаксону	14
1.4. Профілактична дія пробіотиків в запобіганні порушенням транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотика цефтріаксону	23
1.4.1. Вплив мультипробіотика Симбітер на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів	23
1.4.2. Вплив лікарського засобу «Ентерол» на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів	25
Список використаних джерел	28
Розділ 2. ВІДДАЛЕНІ НАСЛІДКИ АНТИБІОТИКО-ТЕРАПІЇ – РИЗИК РОЗВИТКУ ЗАПАЛЕННЯ КИШЕЧНИКА (Толстанова Г.М., Голота Ю.В., Закордонець Л.В., Довбинчук Т.В.)	33
2.1. Склад мікробіоти – клінічні спостереження та експериментальні дослідження	33
2.2. Коротколанцюгові жирні кислоти – основні метаболіти кишкової мікробіоти	36
2.2.1. Роль мембранних транспортерів у процесах обміну коротколанцюгових жирних кислот	42

2.2.2. Роль рецепторів коротколанцюгових жирних кислот у реалізації їх сигнальної функції	46
2.3. Бар'єрна функція кишечника та механізми її порушення	52
Список використаних джерел	70
Розділ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ ВІДДАЛЕНИМ НАСЛІДКАМ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ (Сергійчук Т.М., Загородонець Л.В., Крамарев С.О., Янковський Д.С., Толстанова Г.М.)	
3.1. Експериментальне обґрунтування ефективності різних режимів введення мультипробіотика Симбітер для запобігання віддаленим наслідкам впливу антибіотика широкого спектра дії цефтріаксону на гомеостаз кишечника	82
3.2. Клінічні дослідження ефективності мультипробіотика Симбітер для запобігання віддаленим наслідкам лікування антибіотиками широкого спектра дії у дітей	113
Список використаних джерел	123
Розділ 4. РОЛЬ TRP КАНАЛІВ У ПІДТРИМАННІ ГОМЕОСТАЗУ КИШЕЧНИКА (перспективи для подальших досліджень) (Жолос О.В., Толстанова Г.М.)	
4.1. Прозапальні фактори і TRP канали	138
4.2. Метаболіти бактеріального походження як регулятори активності TRP каналів	139
4.3. Роль TRP каналів у формуванні мікробіоти кишечника	141
4.4. Невирішені проблеми та перспективи	142
Список використаних джерел	145

РОЗДІЛ 1

ПРОБІОТИКИ НА ВАРТІ АНТИБІОТИКОАСОЦІЙОВАНОЇ ДІАРЕЇ

*Г. М. Толстанова, Л. В. Загородонець, Т. В. Довбинчук,
О. С. Крамарев*

1.1. Епідеміологія та етіопатогенез антибіотикоасоційованої діареї

Сучасну медицину неможливо уявити без прийому різних антибактеріальних препаратів. Антибіотики є одним із провідних класів лікарських засобів, які застосовують у боротьбі з бактеріальними інфекціями. Їх відкриття радикально змінило можливості сучасної медицини. На сьогоднішній день у медицині використовують декілька десятків антибіотиків різних груп: β -лактамази (пеніциліни, цефалоспорины), макроліди (еритроміцин, олеандоміцин, азитроміцин), аміноглікозиди (лінкоміцин, кліндаміцин), тетрацикліни тощо [Lakshmi R., 2014; Coates A. R. M., 2011]. Антибактеріальна терапія займає значне місце у лікуванні хворих усіх вікових категорій і посідає друге місце за частотою призначень. Однак до призначення антибіотиків потрібно підходити з обачністю, пам'ятаючи про розвиток численних побічних реакцій, однією з яких є антибіотикоасоційована діарея.

Антибіотикоасоційована діарея – це, як мінімум, три і більше епізодів неоформлених випорожнень, які трапляються на тлі застосування антибактеріальних препаратів чи впродовж 4–8 тижнів після їх відміни. Частота розвитку такого стану становить 5–30 % [Hickson M., 2011]. Антибіотикоасоційована діарея може розвиватися незалежно від шляху введення антибіотиків (пероральний, парентеральний і навіть трансва-

гінальний). Антибіотикоасоційована діарея може розвиватися за участі різних механізмів та проявлятися себе широким діапазоном клінічних ознак та симптомів [Костюкевич О. И., 2010]. Антибіотикоасоційована діарея може варіювати від легкого до важкого ступеня. Практично будь-який антибіотик може бути причетний до виникнення антибіотикоасоційованої діареї, навіть короткі курси антибіотиків та профілактичне їх застосування перед операцією [John G., 2002]. Для профілактики антибіотикоасоційованої діареї важливо зрозуміти патофізіологію та фактори ризику її розвитку.

На сьогодні виділяють два типи антибіотикоасоційованої діареї: 1) діарея, зумовлена мікроорганізмом *Clostridium difficile* (*C. difficile*), яка складає близько 20 % усіх випадків [Костюкевич О. И., 2010; Bartlett J. G., 2002]; 2) решта 80 % – це ідіопатична діарея, тобто нез'ясованої етіології.

Нормобіота товстої кишки є складною екосистемою мікроорганізмів, яка відіграє ключову роль у гомеостазі шлунково-кишкового тракту [McCracken V. J., 2013; Янковский Д. С., 2008]. Глобальні зміни в складі й кількості мікробіоти кишечника (навіть за відсутності розростання патогенних мікроорганізмів) можуть призвести до антибіотикоасоційованої діареї [Reisinger C., 2005; Марушко Ю. В. 2007; Посохова К. А., 2005]. *C. difficile* – анаеробна спороутворююча грампозитивна бактерія, яка вперше була описана в 1935 р. [Beaugerie L., 2004; Spencer R. C., 1998]. Вміст *C. difficile* у нормальній мікробіоті кишечника – 0,01–0,001 %. У здорових осіб частота висівання *C. difficile* становить 3–6 %. Спори *C. difficile* резистентні до стандартних дезінфікувальних засобів і можуть перебувати в аеробних умовах до 3 років. Вегетативні форми *C. difficile* продукують токсин А, який пошкоджує стінку кишечника, цитотоксин (токсин В), який має виражені цитопатогенні властивості, та бінарний токсин [Rohde C. L., 2009; Bartlett J. G., 2006; Spencer R. C., 1998; Carter G. P., 2010]. Токсин А стимулює гуанілатциклазу, підвищує секрецію рідини у просвіт кишечника, що сприяє розвитку діареї. Токсин В чинить цитопатогенну дію через інгібування білкового синтезу й пошкодження

мембрани ентеро- і колоноцитів, стимулює апоптоз епітеліальних клітин шляхом впливу на АТФ-залежні калієві канали мітохондрій, що супроводжується втратою клітинами іонів калію та електролітними порушеннями [Ng J., 2009; Viscidi R. 1983; Sanchez-Hurtudo K. 2008; Leffler D. A., 2009].

Є три ключові чинники розвитку цієї інфекції: застосування антибіотиків [Bartlett J. G., 2006], похилий вік [Karlström O. A., 1998] і госпіталізація [Wiström J., 2001]. *C. difficile* легко поширюється від пацієнта до пацієнта. Отже, початкові спалахи можуть швидко розвиватися і в інших пацієнтів, якщо не дотримуються санітарні норми.

Надмірний ріст бактерії *C. difficile*, може призвести до значних ускладнень, таких як паралітична кишкова непрохідність, дилатація і перфорація товстої кишки [Berg A. M., 2013; Mylonakis E., 2001; Beaugerie L., 2004].

У наших дослідженнях на щурах (рис. 1.1), яким вводили антибіотик цефалоспоринового ряду цефтріаксон, розвивалася діарея у 13 % тварин після 5-добового введення.

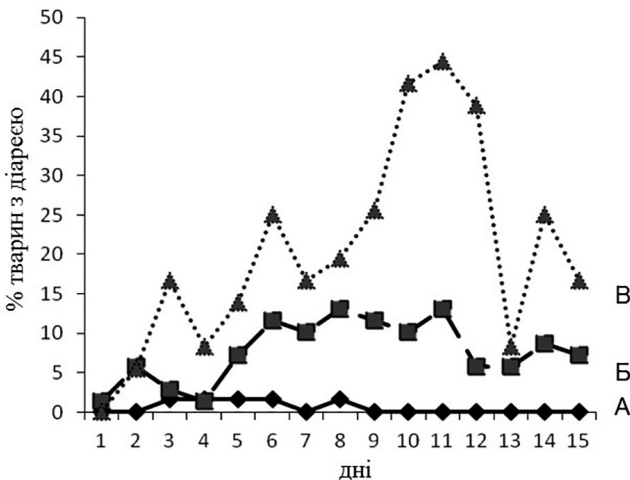


Рис. 1.1. Розвиток діареї у щурів контрольної групи (А) та на фоні введення цефтріаксону в дозах 50 мг/кг внутрішньом'язово (Б) та 300 мг/кг внутрішньом'язово (В).

Збільшення тривалості антибіотикотерапії до 14 днів зменшувало кількість тварин з діареєю до 6 %, що свідчить про її транзиторий характер. 50 мг/кг – це клінічна доза для цефтріаксону. Ми взяли до уваги факт, що при розрахунку еквівалентної дози препаратів враховується коефіцієнт відносної площі поверхні тіла, для щурів він дорівнює 6, відповідно – еквівалентна клінічній дозі для щурів буде не 50, а 300 мг/кг. Збільшення дози цефтріаксону до 300 мг/кг викликало діарею у більшого числа щурів, проте характер її перебігу був таким же, як при дозі 50 мг/кг, що свідчить про транзиторий перебіг антибіотикоасоційованої діареї. При цьому, після 5-добового введення цефтріаксону в жодній із досліджуваних тварин не було позитивного тесту на *C. difficile* токсин А та В. Проте на 14-й день 25 % тварин були позитивними на *C. difficile* токсини А та В.

У клінічних дослідженнях [Hove et al., 1996] на пацієнтах, які отримували перорально супресивну антибіотикотерапію протягом 12 днів (цефуроксим, тобраміцин, ністатин тричі на день), діарея розвивалася у 87 % (13 із 15) пацієнтів. Лише у двох пацієнтів висівали *C. difficile* під час терапії, тоді як у 6 із 15 пацієнтів (45 %) висівали *C. difficile* після припинення антибіотикотерапії; жоден із них не мав діареї. Діарея також мала транзиторий характер, незважаючи на постійне лікування антибіотиками. Ці висновки, разом із нашими експериментальними даними, підтверджують думку про те, що цитотоксичні ефекти *C. difficile* є менш поширеним етіологічним фактором розвитку антибіотикоасоційованої діареї.

Патогенез ідіопатичної антибіотикоасоційованої діареї (не виявлений конкретний збудник діареї) може залежати від механізму антибактеріальної дії різних груп антибіотиків. Розвиток антибіотикоасоційованої діареї пов'язують із посиленням моторики кишечника (макроліди з чотирнадцятичленним лактонним кільцем); підвищенням внутрішньопросвітнього осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків (цефоперазон, цефіксим); підвищенням активності секреторної функції кишечника у відповідь на порушення декон'югації жовчних кислот чи зміни вмісту коротколанцю-

гових жирних кислот, зі зрушенням у складі та метаболічній активності кишкової мікробіоти (характерно для антибіотиків широкого спектра дії: флуороквінолони, цефалоспорини, кліндаміцин тощо) [Костюкевич О. И., 2010]. Бактерії товстої кишки, особливо деякі анаероби, метаболізують вуглеводи, як джерело енергії, що виробляють молочну кислоту і коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), причому останні легко поглинаються товстою кишкою [Cummins J. H., 1987; Ардатская М. Д., 2003; Lefebvre P. et al., 2009]. Втрата цих бактерій внаслідок лікування антибіотиками може призвести до збільшення кількості вуглеводів у просвіті ободової кишки, що спричиняє осмотичну діарею.

Товста кишка є важливим фізіологічним бар'єром на шляху виникнення діареї. Її всмоктувальна здатність у людини сягає 6 л води за добу і, лише, у випадку її підвищеного надходження виникає діарея [Kunzelmann K., 2002]. Парацелюлярний транспорт води через міжклітинні проміжки епітелію товстої кишки відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється транспортом електролітів, переважно Cl^- та Na^+ . Також часткове всмоктування води відбувається трансцелюлярно за допомогою аквапоринових каналів мембрани колоноцитів [Ricanek P., 2015]. Діарея, особливо інфекційного походження, може бути наслідком або збільшення секреції рідини та електролітів, або зменшення їх всмоктування, або обох процесів одночасно (Hoque et al., 2012). Отже, порушення транспорту іонів та води через епітелій товстої кишки є більш імовірним фактором розвитку антибіотикоасоційованої діареї.

1.2. Транспортна функція епітелію товстої кишки в механізмах розвитку антибіотикоасоційованих діарей

Аналіз літературних даних вказує на те, що питання змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі антибіотикоасоційованої діареї, з огляду на механізм дії різних груп антибіотиків, є малодослідженим, хоча поодинокі дані існують.

Внутрішньопросвітна перфузія антибіотика лінкозамідного ряду кліндаміцину помітно пригнічувала транспорт води в кишечнику та стимулювала сумарну секрецію в дослідженнях на моделі перфузії ділянки клубової кишки, тонкої та товстої кишки *in vivo*. Автори не змогли розкрити механізм порушення транспортної функції епітелію, спричинених кліндаміцином, але показали, що системи цАМФ або цГМФ, підвищена проникність слизової або зміни морфології слизової оболонки не задіяні в цьому процесі [Giannella et al., 1981]. Масштабне дослідження (Roberts et al., 1991) ефекту різних груп антибіотиків (лінкозамідів кліндаміцину та лінкоміцину; макроліда еритроміцину; аміноглікозида гентаміцину; бета-лактамного антибіотика ампіциліну; глікопептидного антибіотика ванкоміцину) на транспорт іонів було проведене на дистальній частині епітелію товстої кишки кролів. Кліндаміцин, еритроміцин, гентаміцин та лінкоміцин знижували реакцію епітелію на стимуляцію електричним полем. Кліндаміцин та лінкоміцин знижували базальний струм короткого замикання та реакцію епітелію на ацетилхолін. Ванкоміцин посилював секреторну дію простагландину E2. Однак ампіцилін не дав жодного ефекту. В інших дослідженнях на культурі епітелію товстої кишки людини виявили прямий вплив двох пептидних антибіотиків, дураміцину та Ro 09-0198, на апікальну клітинну мембрану. Антибіотики спричиняли збільшення транспорту іонів за рахунок регуляції електрогенного транспорту натрію [Goldhill J. M. et al., 1996].

У нашому дослідженні ми порівняли ефект парентерального шляху введення антибіотиків (цефалоспорин цефтріаксон), який зменшує будь-який прямий вплив антибіотиків на епітеліальні клітини, з ефектом антибіотиків, застосованих перорально (макролід азитроміцин та цефалоспорин цефіксим) (Довбинчук Т. В. та ін., 2015). Антибіотики широкого спектра дії ряду макролідів (азитроміцин) та цефалоспоринів (цефтріаксон, цефіксим) є найбільш вживаними в клінічній практиці. За механізмом дії цефалоспорини мають бактерицидний ефект, а макроліди – бактеріостатичний [Poulsen S. M., 2000; Bush K., Bradford P. A., 2016]. За даними літератури, при при-

значенні цефалоспоринів діарея виникає у 4–9 % випадків, а макролідів – у 2–5 % випадків [Костюкевич О. И., 2010].

Для визначення сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки ми використали метод перфузії ізольованої ділянки товстої кишки *in situ* [Scheld H. P., 1966]. В якості неабсорбованого маркера застосовували 20 мг/л фенолового червоного.

Уведення цефтріаксону впродовж 5 діб у дозі 50 мг/кг викликало зменшення всмоктування води на 47,5 %, Na^+ – на 28,8 %, рівня секреції K^+ – на 25,4 %. Рівень всмоктування Cl^- не змінювався (рис. 1.2 А). Цефтріаксон у дозі 300 мг/кг призводив до зменшення сумарного рівня всмоктування води на 27,8 %, Cl^- – на 18,3 %, секреції K^+ – на 46,4 %. Рівень всмоктування Na^+ не змінювався (рис. 1.2 Б). Отже, спостерігався односторонній вплив доз 50 та 300 мг/кг на транспорт води – обидві дози викликали її зменшення. В клінічній практиці при лікуванні тяжких інфекційних захворювань, наприклад, менінгіту [Amelieke J. H. et al., 2014], тривалість курсу антибіотикотерапії збільшується з 5 до 14 днів.

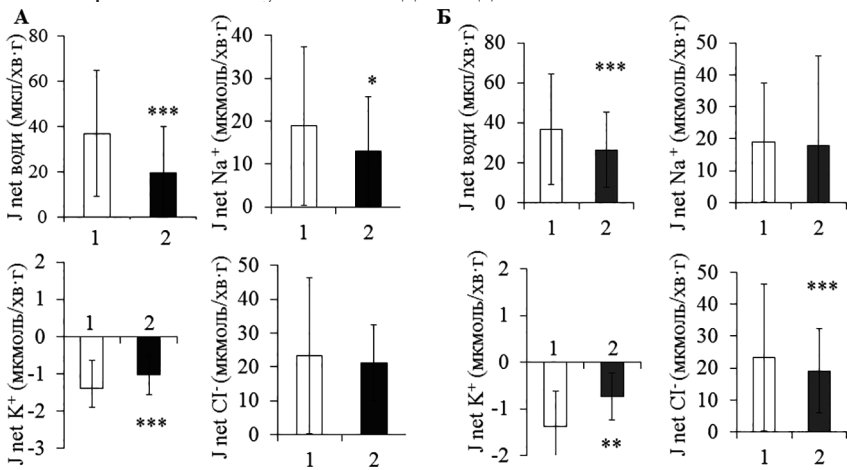


Рис. 1.2. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки шурів після 5-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг ($n=14$) (А) та 300 мг/кг ($n=7$) (Б). 1 – вода; 2 – цефтріаксон.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг впродовж 14 діб зумовлювало вірогідне зниження рівня всмоктування води на 38,8 %, Cl^- – на 27,5 %, секреції K^+ – на 34,7 %, а також збільшення всмоктування Na^+ на 40,2 % (рис. 1.3 А).

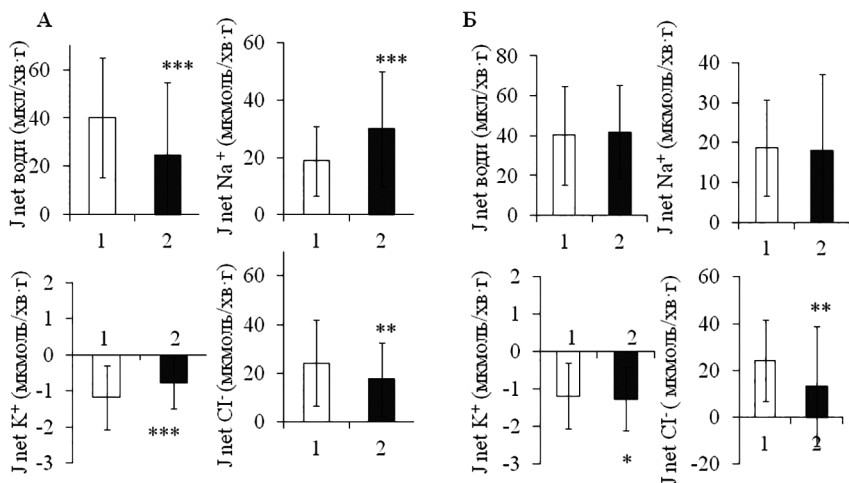


Рис. 1.3. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтріаксону 50 мг/кг (n=7) (А) та 300 мг/кг (n=5) (Б). 1 – вода; 2 – цефтріаксон.
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Уведення шурам цефтріаксону в дозі 300 мг/кг впродовж 14 днів викликало зменшення сумарного потоку Cl^- на 44,1 % ($p < 0,01$) та незначне збільшення секреції K^+ на 6,8 % ($p < 0,05$). Статистично вірогідних змін у показниках сумарного потоку води та Na^+ не було (рис. 1.3 Б).

Отримані результати вказують на зміни у рівні сумарного потоку іонів хлору в залежності від збільшення тривалості введення антибіотика та підвищення його дози (табл. 1.1).

Відомо, що збільшення секреції Cl^- через CFTR канали є ключовим механізмом секреторної діареї [Field M., 2003]. З іншого боку, секреція Cl^- необхідна для «вимивання» умовно-патогенної флори з поверхні кишечника та відновлення слизового бар'єра [Gareau M. G., Barrett K. E., 2013; Gustafsson J. K.,

2013]. Нашими колегами було встановлено зрушення у складі пристінкової мікробіоти кишечника щурів, але не зафіксовано росту патогенної мікробіоти після введення цефтріаксону впродовж 5–14 днів, що свідчить на користь отриманих нами даних [Путников А. В., 2012].

Таблиця 1.1. Узагальнена таблиця сумарних потоків води та іонів через епітелій товстої кишки щурів при застосуванні антибіотика цефалоспоринового ряду цефтріаксону

Сумарний потік	Цефтріаксон			
	5-добове введення, внутрішньом'язово		14-добове введення, внутрішньом'язово	
	50 мг/кг	300 мг/кг	50 мг/кг	300 мг/кг
Вода (абсорбція)	↓	↓	↓	Без змін
Na ⁺ (абсорбція)	↓	без змін	↑	Без змін
K ⁺ (секреція)	↓	↓	↓	↑
Cl ⁻ (абсорбція)	Без змін	↓	↓	↓

Примітка. ↑ – збільшення; ↓ – зменшення.

Пероральне введення іншого антибіотика цефалоспоринового ряду – цефіксиму – не викликало діареї у щурів. При цьому спостерігалось навіть збільшення всмоктування води та Cl⁻. Сумарний потік K⁺ вірогідно не змінювався, проте сумарний потік Na⁺ знижувався. Пероральне введення макроліда азитроміцину також не викликало діареї у щурів. Проте, спостерігались значні зміни показників сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів. Зокрема, всмоктування води збільшувалося на 145,2 %, Na⁺ – на 75,4 % та Cl⁻ – на 25,1 %. Секреція K⁺ зменшувалася на 6,3 % (табл. 1.2).

Отже, ефекти, викликані цефіксимом та азитроміцином, які, на відміну від цефтріаксону, вводили перорально, відрізняються від останнього. Це дозволяє припустити, що механізм антибіотикоасоційованої діареї може залежати не лише від природи антибіотичної дії, а й від шляху введення анти-

біотика. На користь нашого припущення свідчать ретроспективні дослідження [Murthy J. L., 2016], в яких встановлено, що інтраперитонеальне введення антибіотиків, на відміну від перорального, в 4 рази підвищує ризик розвитку побічних ефектів, зокрема діареї.

Таблиця 1.2. Узагальнена таблиця сумарних потоків води та іонів через епітелій товстої кишки щурів при застосуванні антибіотика цефалоспоринового ряду цефіксиму та макроліда азитроміцину

Сумарний потік	Цефіксим 10 мг/кг, per os (7 днів)	Азитроміцин 15 мг/кг, per os (5 днів)
Вода (абсорбція)	↑	↑
Na ⁺ (абсорбція)	↓	↑
K ⁺ (секреція)	↓	↓
Cl ⁻ (абсорбція)	↑	↑

Примітка. ↑ – збільшення; ↓ – зменшення.

Оскільки при парентеральному введенні антибіотичних препаратів виключений (чи мінімізований) прямий ефект антибіотиків на епітелій кишечника, найімовірніше, що всі зміни, які спостерігаються у порушенні транспортної функції кишечника і, відповідно розвитку антибіотикоасоційованої діареї, пов'язані зі змінами в нормобіоті кишечника.

1.3. Механізми, що лежать в основі транзитornoї антибіотикоасоційованої діареї за дії антибіотика цефалоспоринового ряду цефтріаксону

Транспортна функція епітелію товстої кишки характеризується абсорбцією NaCl, коротколанцюгових жирних кислот (SCFA) та води, що дозволяє видаляти разом з фекальними масами дуже невелику кількість води та солей (K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻) [Kunzelmann et al., 2002; Kiela et al., 2009]. Всмоктувальна / абсорбційна здатність слизової оболонки товстої киш-

ки залежить від активності та кількості транспортерів, таких як водний канал (здебільшого *Aqp8*), електронейтральний Na^+ / H^+ – обмінник (*Slc9a3*), електрогенний Na^+ канал (*ENaC/Scnn1b*), електрогенний Cl^- канал (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*), $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ обмінник-канал *Slc26a3* (downregulated in adenoma, *DRA*), обмінник $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$, $\text{HCO}_3^- / \text{SCFA}$ та інші [Kunzelmann et al., 2002].

Патогенні бактерії, а також коменсали, можуть безпосередньо впливати на транспортну функцію епітелію товстої кишки, регулюючи активність та / чи експресію іонних транспортерів, наприклад, інфікування *S. rodentium* призводило до підвищення експресії транспортерів *CFTR*, *DRA* та *Slc9a3* [Spehlmann et al., 2009]; пероральне введення *Salmonella enterica serovar Typhimurium* знижувало експресію *DRA*, *Scnn1b* і спричиняло інтерналізацію *Cftr* каналів в епітеліальних клітинах товстої кишки мишей [Marchelletta et al., 2013]; *B. breve* пригнічував стимульовану карбахоліном та, меншою мірою, форсколіном секрецію Cl^- на культурі епітеліальних клітин HT29-19A [Liu et al., 2020]; *L. acidophilus* суттєво підвищував активність обміну через електронейтральний $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ обмінник *DRA* шляхом збільшення його експресії на апікальному боці ентецитів *in vitro* та *in vivo* [Shubha Priyamvada et al., 2015].

Введення щурам цефтріаксону в дозі 50 мг/кг (внутрішньом'язово) призводило до зниження, порівняно з контрольною групою, рівня анаеробних бактерій *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium spp.* у фекальному біоптаті щурів після 5- та 14-добової терапії, але ці зміни були в межах нормальних показників. При цьому число аеробних умовно-патогенних ентеробактерій (*Citrobacter spp*, *Kleibselia spp*, *Proteus spp*) та *S. aureus* було вірогідно підвищено після 5-добової терапії та поверталось до контрольних показників при збільшенні тривалості терапії до 14 днів. Число *E. coli* було вірогідно зменшено у всіх досліджуваних термінах, переважно за рахунок зниження числа лактозо (+) *E. coli*.

У наших дослідженнях 5-добове введення цефтріаксону викликало просекреторні зміни в епітелії товстої кишки (див.

рис. 1.2). На молекулярному рівні це супроводжувалось зниженням експресії мРНК електрогенних натрієвих каналів ENaC/Scnn1b, які відповідають за активне всмоктування іонів натрію; збільшенням експресії мРНК електрогенних хлорних каналів CFTR, які обумовлюють секрецію хлору. Експресія мРНК електронейтрального Na⁺/H⁺ обмінника (NHE3/Slc9a3) не змінювалась (рис. 1.4).

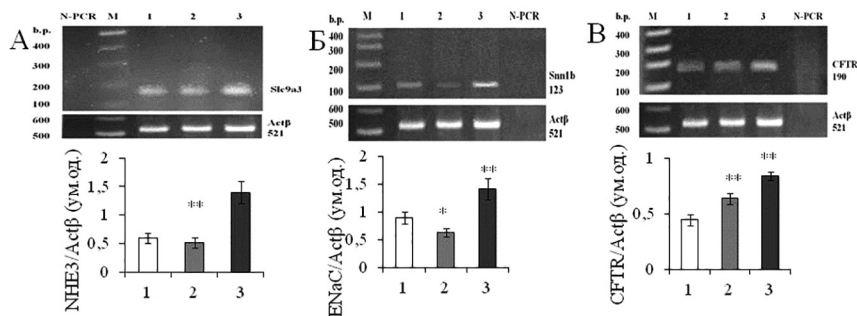


Рис. 1.4. Рівень експресії NHE3/Slc9a3 (А), ENaC/Scnn1b (Б) та CFTR (В) в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово): 1 – контроль (n=5); 2 – цефтріаксон 5 діб (n=5); 3 – цефтріаксон 14 діб (n=5). * – p<0,05, ** – p<0,01 відносно показників у контрольній групі.

Після 14-добового введення цефтріаксону відбувалось підвищення всмоктування Na⁺, проте спостерігалась реверсія абсорбції на секрецію Cl⁻ (рис. 1.3 А), що на молекулярному рівні супроводжувалось підвищенням експресії мРНК ENaC та Na⁺/ H⁺ обмінника. При цьому спостерігалось збільшення експресії мРНК CFTR, порівняно з показниками після 5 діб (рис. 1.4).

Ми не спостерігали значних змін в експресії мРНК водного каналу AQP8. У зв'язку з тим, що рівень мРНК не завжди відображає рівень протеїнів, що кодуються, ми перевірили відносну кількість протеїну AQP8 у слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис. 1.5 А). Введення цефтріаксону впродовж 5 діб не викликало змін рівня протеїну AQP8, проте після

його 14-добового введення рівень AQP8 зменшився в 3 рази ($p < 0,001$) (рис. 1.5 Б) [Довбинчук Т. В. та ін. 2015]. Слід підкреслити, що антибіотик азитроміцин, який, навпаки, підвищував всмоктування води через епітелій товстої кишки (табл. 1.2), зумовлював підвищення рівня протеїну AQP8 в 1,2 рази ($p < 0,05$) (рис. 1.5 В).

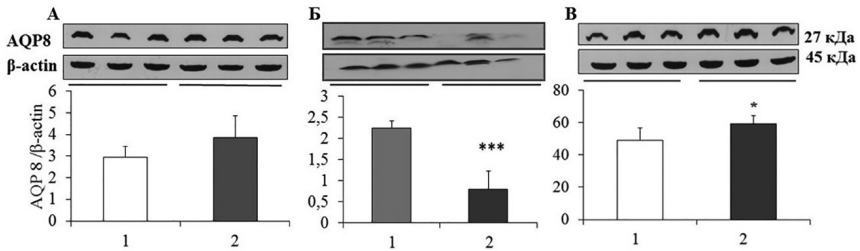


Рис. 1.5. Вестерн-блот аналіз рівня протеїну AQP8 у слизовій оболонці товстої кишки щурів, після 5- (А) та 14-добового (Б) введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово, $n=5$) чи 5-добового введення азитроміцину (15 мг/кг, *per os*, $n=6$) (В): 1 – контроль; 2 – антибіотик. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

Слизова оболонка товстої кишки вкрита шаром слизу, який захищає епітелій від механічних пошкоджень та хімічних подразників [Johansson M. E., 2011]. Вважають, що динамічні зміни товщини і складу слизового шару на поверхні епітеліальних клітин є захисним механізмом організму від патогенних уражень. У літературі описано, що інфікування *S. Rodentium* викликає зміни товщини слизового шару в експлантах тканини. Стадія найбільшого потовщення збігається з початком зменшення кількості бактерій на 14 день після зараження. Крім того, шар слизу, який завжди є на поверхні здорової товстої кишки, ледве виявлявся у період загострення інфекції (через 10 днів після зараження), але потім відновлювався, хоча й у менш структурованому вигляді [Gustafsson et al., 2013]. Перенесення *E. coli* з вмісту кишечника звичайних дитинчат щурів до організму стерильних дорослих щурів призводило

до швидкого виснаження слизу келихоподібних клітин. Кількість муцину поступово поверталася до початкового рівня, що було пов'язано зі зростанням KLF4 і білків-інгібіторів клітинного циклу p21 і p27 [Tomas et al., 2015]. В обох дослідженнях [Gustafsson et al., 2013, Tomas et al., 2015] зміни в шарі слизу супроводжувалися секрецією іонів, змінами активності іонних транспортерів і експресії водних каналів. Як правило, секреція рідини через епітелій кишечника спрямована на «вимивання» потенційних патогенів або шкідливих речовин, таких як токсини [Gareau et al., 2013]. Просекреторні зміни дозволяють реструктуризувати шар слизу на поверхні епітеліальних клітин, витісняючи патогени до зовнішнього шару слизу, де їх потім витісняє відновлена симбіотична флора [Gustafsson et al., 2013].

Введення цефтріаксону (50 мг/кг) щурам впродовж 5 днів призводило до зменшення у 3 рази ($p < 0,01$) шару слизу на поверхні епітелію товстої кишки. Після 14-добового введення, навпаки, спостерігалось посилення секреції слизу і, відповідно, збільшення його рівня в 2,5 рази (рис. 1.6 А). Ці зміни були обумовлені як вивільненням слизу із келихоподібних клітин (Goblet cells), так і секрецією слизу *de-novo*, оскільки експресія гена основного білка слизу *Muc2* муцину також збільшувалася (рис. 1.6 Б).

Порушення слизового бар'єра сприяє контакту мікробіоти з епітелієм кишечника і може запускати прозапальну відповідь. Відомо, що у пацієнтів на тлі викликаних застосуванням антибіотика дисбіотичних процесів виникають прозапальні зміни в слизовій оболонці кишечника [Bringiotti R., 2014], які, в свою чергу, можуть призводити до розладу транспортної функції епітелію. Морфометричний аналіз гістологічних зразків товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону свідчить про виражений набряк і десквамацію епітелію та зменшення площі келихоподібних клітин (табл. 1.3), що характерно для процесу запалення.

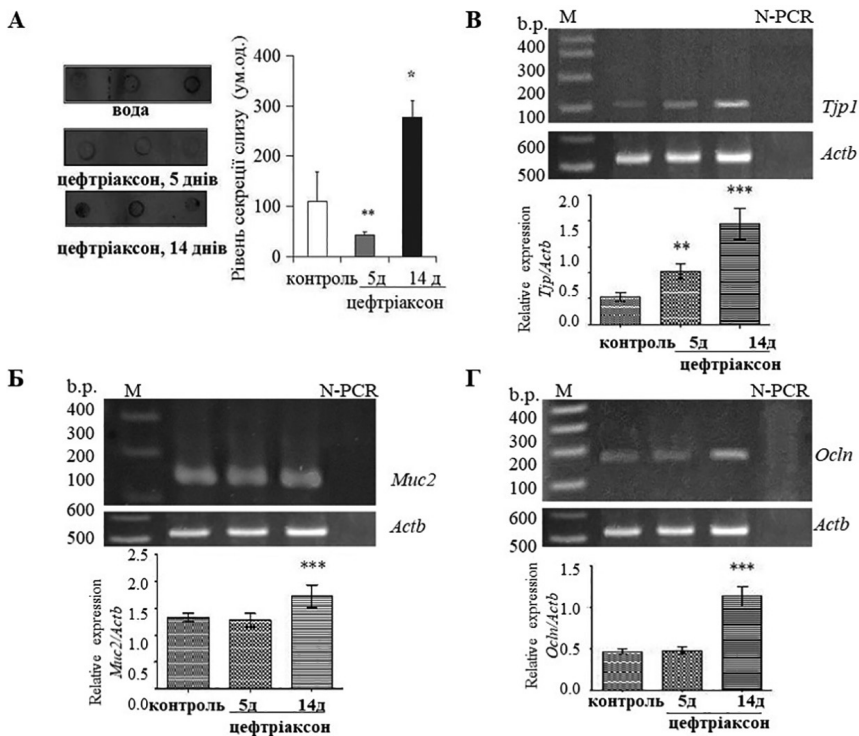


Рис. 1.6. Рівень секреції слизу в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово), ШИК-реакція на PVDF мембрані (А). Рівень експресії муцину *Muc2* (Б), генів білків щільних контактів *Zonula occluden-1* (*Tjp1*) (В) та оклюдину *Oc1n* (Г) в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово), РТ-ПЛР. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, відносно показників у контрольній групі.

Таблиця 1.3. Морфометричний аналіз слизової оболонки товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово)

Показники	Контроль	Цефтріаксон
Товщина слизової оболонки, мкм	138,03±34,85	215,02±34,85***
Глибина крипт, мкм	129,47±18,5	179,42±40,52***

Показники	Контроль	Цефтріаксон
Площа поперечного перерізу ядер еритроцитів, мкм ²	14,85±4,85	20,52±5,0***
Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин, мкм ²	72,94±31,62	62,08±28,55*

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

Більше того, цитохімічний аналіз виявив зменшення в 2,4 раза ($p < 0,05$) кількості гранул опасистих клітин (показник активації клітин) після введення цефтріаксону, натомість азитроміцин не викликав ніяких змін (рис. 1.7).

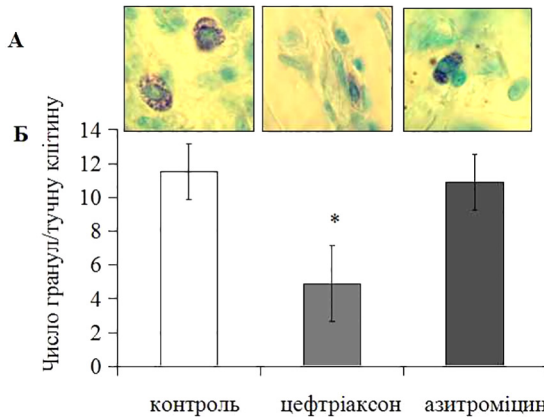


Рис. 1.7. Рівень дегрануляції опасистих клітин після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово, $n=5$) та азитроміцину (15 мг/кг, *per os*, $n=5$): А – цитохімічне визначення опасистих клітин толуїдиновим синім. Б – середнє значення кількості гранул на тучну клітину. * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Основним медіатором опасистих клітин є гістамін – потужний стимулятор секреції через епітелій товстої кишки [Xu J. D., 2012] та класичний медіатор гострого запалення. В

нашій роботі [Довбинчук Т. В. та ін., 2016] поєднане введення блокатора H_1 -гістамінових рецепторів лоратадину знижувало відсоток тварин з діареєю, викликаную цефтріаксоном, з 6–12 % щурів до 2–4 %. Ці зміни супроводжувалися підвищенням сумарного потоку води на 95,2 % та секреції K^+ на 34,2 %, порівняно з дією самого цефтріаксону, та не впливало на потоки Na^+ та Cl^- (рис. 1.8).

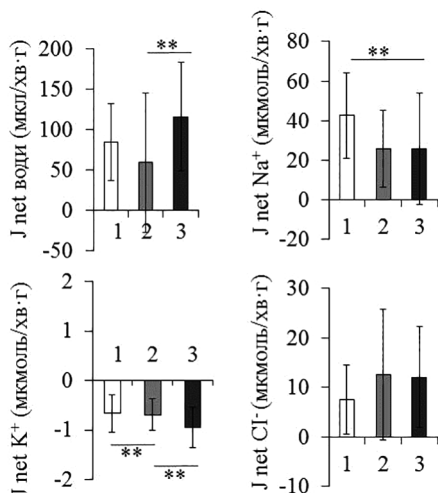


Рис. 1.8. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово) та лоратадину (1,7 мг/кг *per os*): 1 – лоратадин (n=3); 2 – цефтріаксон (n=5); 3 – цефтріаксон і лоратадин (n=5). ** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

В якості подальшого підтвердження прояву захисної реакції епітелію на дію антибіотиків ми виявили в слизовій оболонці товстої кишки значне підвищення рівня мРНК головного білка щільних контактів мембран оклюдину (occluden, Occludin) та його лінкерного білка з цитоскелетом Zonula occludens-1 (Tjp1) після 14-добового введення цефтріаксону (див. рис. 1.6 В, Г). Zonula occludens зв'язує цитоплазматичні мембранні білки,

такі як оклюдини, з цитоскелетом мембран, формуючи щільний контакт. Ці комплекси, разом із внутрішньоклітинними сигнальними білками, є фактором, що обмежує швидкість парацелюлярної проникності; вони запрограмовані на швидке відкриття чи, навпаки, герметизацію бар'єра у випадку травми та інших сигналів [Chelakkot et al., 2018].

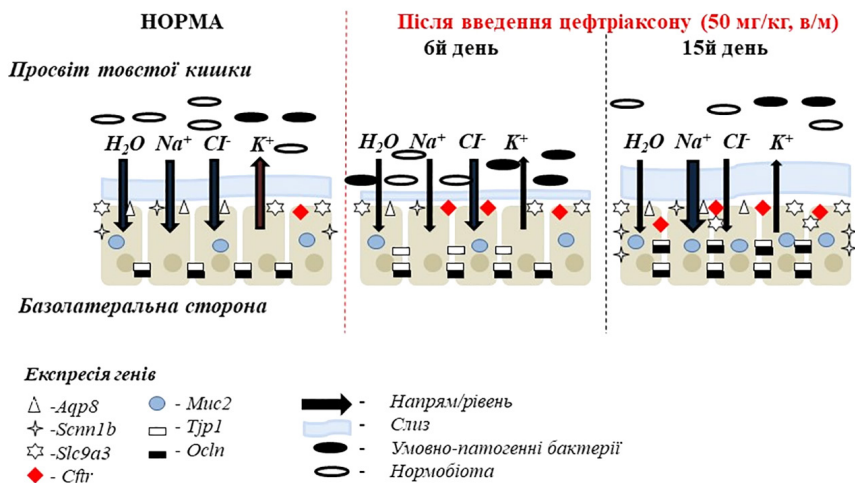


Рис. 1.9. Схематичне зображення молекулярного механізму розвитку транзиторної антибіотикоасоційованої діареї за дії антибіотика цефалоспоринового ряду цефтріаксону.

З вищенаведеного можна зробити висновок, що розвиток транзиторної антибіотикоасоційованої діареї, яка доволі часто спостерігається в клінічній практиці, є насправді добре регульованою на молекулярному рівні фізіологічною захисною відповіддю організму на зміни у складі нормобіоти кишечника.

1.4. Профілактична дія пробіотиків в запобіганні порушенням транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотика цефтріаксону

Для підтвердження ролі мікробіоти у розвитку прозапальних змін в епітелії товстої кишки як фактора порушень транспортної функції епітелію кишечника за умов антибіотико-асоційованої діареї, а також ефективності запобігання їх виникненню за допомогою пробіотичних препаратів, ми дослидили ефекти двох різних пробіотичних препаратів: небактеріальної природи *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) (Ентерол® 250, Biocodex, Франція) та мультипробіотик «Симбітер®» ацидофільний концентрований (ТОВ фірма «О. Д. Пролісок», Україна).

1.4.1. Вплив мультипробіотика Симбітер на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

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

У наших дослідженнях [Dovbynchuk T. V., 2015] введення мультипробіотика впродовж 5 діб приводило до зменшення всмоктування води на 65,6 %, Na^+ на 45,4 %, секреції K^+ на 60,9 %, порівняно з контрольною групою. Сумарний потік іонів Cl^- залишався без змін (рис. 1.10 А). Тобто, мультипробіотик спричиняв просекреторну дію на транспорт води та електролітів, аналогічно до дії антибіотика. При цьому в тварин, яким впродовж 5 днів поєднували введення цефтріаксону з

мультипробіотиком, спостерігалось вірогідне збільшення рівня всмоктування води на 136,5 % та Na^+ на 65,2 %. Сумарні потоки K^+ та Cl^- достовірно не змінювалися (рис. 1.10 А).

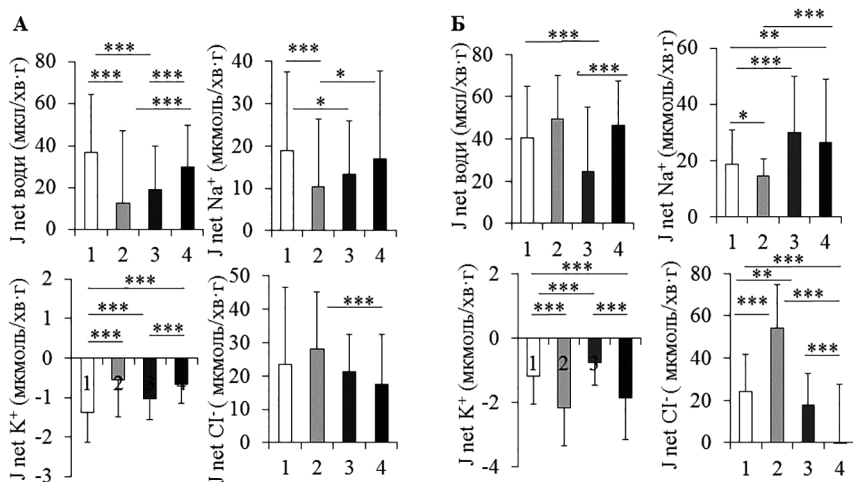


Рис. 1.10. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки шурів після 5- (А) чи 14-добового (Б) введення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово) чи його комбінації з мультипробіотиком ($1,6 \times 10^9$ КУО/кг *per os*): 1 – вода ($n=19$); 2 – мультипробіотик ($n=9$); 3 – цефтріаксон ($n=14$); 4 – мультипробіотик+цефтріаксон ($n=6$). * – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

Введення мультипробіотика впродовж 14 діб не викликало змін сумарного транспорту води через епітелій товстої кишки, але зменшувало рівень всмоктування Na^+ на 22,2 %, K^+ на 83,0 % та збільшувало рівень всмоктування Cl^- на 124,4 %. Поєднане застосування цефтріаксону з мультипробіотиком впродовж 14 діб запобігало порушенням транспортної функції епітелію товстої кишки, викликаним застосуванням антибіотика. Рівні всмоктування Na^+ та секреції K^+ були навіть вищими за контрольні, відповідно на 140,4 % та 157,6 %, а рівень всмоктування Cl^- , порівняно з контрольною групою, знизився в 50 разів (рис. 1.10 Б).

1.4.2. Вплив лікарського засобу «Ентерол» на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

Далі ми перевірили ефект пробіотика небактеріальної природи *S. boulardii*, який має виражений антимікробний ефект [Pontier-Bres R., 2014]. Ми використовували *S. boulardii* (Ентерол® 250, Biocodex, Франція). Одне саше містить ліофілізовані клітини *S. boulardii* (250 мг) та допоміжні речовини: лактози моногідрат, фруктоза, кремнію діоксид колоїдний безводний, смакова добавка «тутті фрукті».

У *Saccharomyces boulardii* виявлена здатність продукувати 54 кДа протеазу, яка безпосередньо інактивує токсини *C. difficile* і блокує епітеліальні рецептори для фіксації *C. difficile* [McFarland L. V. et al. 2010]. Також *Saccharomyces boulardii* стимулюють вироблення імунної відповіді до токсинів А і В *C. difficile* [McFarland L. V. et al. 2010]. Виявлено, що *Saccharomyces boulardii* здатні захищати клітини кишечника та печінки від токсичного впливу антибіотиків (наприклад, кліндаміцину), що проявлялося у зниженні рівня перекисного окиснення ліпідів, зменшенні інфільтрації нейтрофілів. Крім цього, введення *Saccharomyces boulardii* на фоні прийому кліндаміцину запобігало збільшенню часу транзиту по кишечнику, викликаному цим антибіотиком [Duman D. G. et al., 2013].

Оскільки транспорт води здійснюється переважно пасивно, за осмотичним градієнтом, створеним транспортом іонів, збільшення секреції іонів хлору колоноцитами супроводжується виходом води в порожнину кишечника і сприяє розвитку діареї. У товстій кишці секреція хлору здійснюється через цАМФ-залежні (CFTR) і кальцій-активованні (CaCC) хлороселективні канали. D. Czerucka зі співавт. (1999) виявили, що *S. boulardii* здатні пригнічувати секрецію хлору, викликану холерним токсином, як через CFTR канали, так і через CaCC канали [166]. Ми також встановили, що додавання *S. boulardii* (Ентерол® 250) запобігало змінам у транспорті хлору, викликаним цефтріаксоном, і попереджало розвиток діареї. Крім безпосереднього впливу на хлороселективні канали, *S. boulardii*

здатні запобігати розвитку антибіотикоасоційованої діареї за рахунок пригнічення росту патогенних мікроорганізмів і підтримки нормобіоти кишечника. Коротколанцюгові жирні кислоти, які утворюються при розщепленні вуглеводів нормофлори кишечника, посилюють всмоктування хлору через активацію $\text{Cl}^-/\text{K}^+\text{ATPase}$ і $\text{HCO}_3^-/\text{K}^+\text{ATPase}$ обмінників, що також запобігає розвитку діареї.

Поеднане введення *S. boulardii* з цефтріаксоном впродовж 5 діб, запобігало просекреторним ефектам антибіотика (рис. 1.11 А).

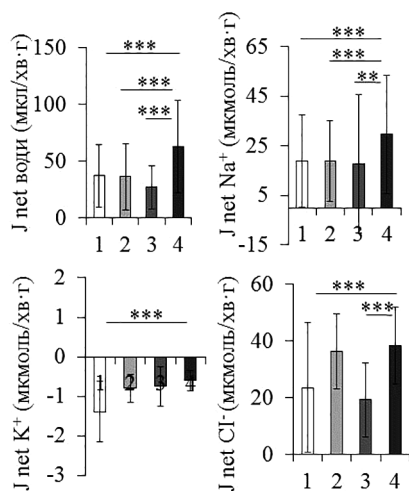


Рис. 1.11. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово) чи його комбінації з *S. boulardii* (10 мг/добу): 1 – вода (n=19); 2 – *S. boulardii* (n=7); 3 – цефтріаксон (n=7); 4 – цефтріаксон ± *S. boulardii* (n=8).** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

Таким чином, застосування *S. boulardii* та мультипробіотика на тлі введення цефтріаксону є обґрунтованим методом профілактики розвитку антибіотикоасоційованої діареї.

Узагальнюючи отримані дані можна припустити, що початкові зрушення у балансі нормобіоти кишечника, чи то

в результаті 5-добового застосування антибіотиків, чи пробіотиків бактеріальної природи, організм сприймає як зсув у гомеостазі. Тому діарея виникає як захисна реакція і, можливо, має запальну природу, що супроводжується швидким вивільненням опасистими клітинами просекреторних медіаторів, зокрема, гістаміну.

Після 14-добового введення пробіотичні бактерії колонізують кишечник і організм приходить до збалансованого співіснування з мікробіотою, тоді як антибіотик продовжує зрушувати цей баланс і навіть призводить до надмірного росту умовно-патогенних бактерій. Відповідно, діарея через 14 днів – це захисна реакція організму, спрямована на вимивання умовно-патогенних бактерій і зменшення їх контакту з епітеліальними клітинами слизової оболонки товстої кишки за рахунок збільшення секреції слизу. На користь нашого припущення свідчать дані про те, що бактерії коменсали *Lactobacillus plantarum* 299v та *Lactobacillus rhamnosus* GG стимулюють продукцію MUC2 та MUC3 колоноцитами [Holly H. et al., 2013]. Це, в свою чергу, відіграє захисну роль та перешкоджає адгезії патогенних мікроорганізмів до епітеліальних клітин слизової оболонки товстої кишки шляхом посилення секреції слизу. Як відомо, цей процес супроводжується паралельним посиленням всмоктування іонів хлору всередину клітини за рахунок електронейтрального обміну з бікарбонат-іонами [Raheja G. et al., 2010].

ВИСНОВКИ

Комплексне застосування мультипробіотика (бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9) та пробіотика на основі *Saccharomyces boulvardii* на фоні терапії цефтріаксоном запобігає розвитку просекреторних змін в епітелії товстої кишки. Цей ефект зумовлений підвищенням всмоктування води, яке асоціювалось зі змінами в сумарному транспорті іонів калію та не залежало від сумарного транспорту іонів натрію та хлору.

Список використаних джерел

1. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. д-ра. биол. наук. Москва, 2003. 45 с.

2. Довбинчук Т.В. А. Базан, Л.В. Загордонец, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова Рівень транспортних протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення антибіотика цефтріаксона. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2015;2(19): С. 68-71.

3. Довбинчук Т.В., Загордонец Л.В., Путніков А.В. та ін. Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за умов експериментального дизбіозу. Фізіологічний журнал. 2015;61(6): 76-85.

4. Довбинчук Т.В., Червінська Т.М., Загордонец Л.В., Толстанова Г.М. Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки. Фізіологічний журнал. 2016;62(1): 94-100.

5. Костюкевич О.И. Антибиотикоассоциированная диарея: мифы и реальность Здоров'я України. 2010;18(247): С. 56-57.

6. Марушко Ю.В., Шеф Г.Г. Профилактика и лечение антибиотикоассоциированных диарей у детей раннего возраста препаратом лицидофил. Перинатология и педиатрия. 2007;(4):65-68.

7. Посохова К.А., Вікторов О.П. Побічна дія антибіотиків аміноглікозидов: сучасний погляд на проблему. Фармацевтичний журнал. 2005;(2):57-58.

8. Путников А.В., Голота Ю.В., Кришук А.Ю., Фурзикова Т.М., Довбинчук Т.В., Толстанова А.Н., Береговая Т.В. Микробиоценоз биопленки толстой кишки крыс в разные сроки после введения цефтриаксона. Медицинский академический журнал. 2012: 311-313. (ВИНИТИ РАН, «Ulrich's Periodicals Directory»).

9. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микрофлора и здоровье человека. – Київ: ТОВ «Червона Рута-Турс»; 2008. 552 с.

10. Amelieke Cremers J.H., Sprong T., Jeroen A.S. et al. Cremers Effect of antibiotic streamlining on patient outcome in pneumococcal. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014;69:2258-2264. doi:10.1093/jac/dku109.

11. Bartlett J.G. Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease. Ann Intern Med. 2006;145:758-64.

12. Beaugerie L., Petit J.C. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhea. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004;18:337-52.

13. Berg A.M., Kelly C.P., Farraye F.A. Clostridium difficile infection in the inflammatory bowel disease patient *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(1):194-204. doi: 10.1002/ibd.22964.

14. Bringiotti R., Ierardi E., Lovero R. [et al. Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(4): 550–9. 10.4291/wjgp.v5.i4.550

15. Bush K., Bradford P.A., 2016 β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(8):a025247. doi: 0.1101/cshperspect.a025247.

16. Carter G.P., Rood J.I., Lyras D. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile-associated disease. *Gut Microbes.* 2010;1(1):58–64. doi:10.4161/gmic.1.1.10768

17. Chelakkot C., Ghim J. and Ryu S.H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med.* 2018;50:103 <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>.

18. Coates A.R.M., Halls G., and Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *J Pharmacol.* 2011;163(1):184–194. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x

19. Cummings J.H., Pomare E.W., Branch W.J. et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood *Gut.* 1987;28: 1221-1227.

20. Dovbynychuk T.V., Zakordonets L.V., Baban V.N., Chervinska T.N., Tolstanova G.N. The effect of multi-species probiotic on antibiotic-induced changes in colonic ion and water transport. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2015;6(6): 896-901.

21. Duman D.G., Kumral Z.N., Ercan F. et al. Saccharomyces boulardii ameliorates clarithromycin-and methotrexate-induced intestinal and hepatic injury in rats. *Br. J. Nutr.* 2013;(2): 1-7.

22. Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest.* 2003;111(7): 931-943. doi: 10.1172/JCI200318326.

23. Gareau M.G., Barrett K.E. Fluid and electrolyte secretion in the inflamed gut: novel targets for treatment of inflammation-induced diarrhea. *Current opinion in pharmacology.* 2013;13(6): 895-9. doi:10.1016/j.coph.2013.08.014.

24. Giannella, R.A., Serumag, J., Walls, D., and Drake, K.W. Effect of clindamycin on intestinal water and glucose transport in the rat. *Gastroenterology* 1981;80(5 pt 1): 907–13. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(81\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(81)90058-5).

25. Goldhill J.M., Rose K., Percy W.H. Effects of antibiotics on epithelial ion transport in the rabbit distal colon in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48(6): 651-6.

26. Gustafsson J.K., Navabi N., Rodriguez-Piñeiro A.M. et al. Dynamic changes in mucus thickness and ion secretion during *Citrobacter rodentium* infection and clearance. *PloS One*. 2013;8(12): e84430. doi:10.1371/journal.pone.0084430
27. Hickson M. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection *Therap Adv Gastroenterol*. 2011;4(3):185-197.
28. Holly H., Jennifer H., Eleanor L. et al. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal. Defences: Homeostasis and Immunopathology. 2013;5: 1869-1912. doi:10.3390/nu5061869.
29. Hoque, K.M., Chakraborty, S., Sheikh, I.A., and Woodward, O.M. New advances in the pathophysiology of intestinal ion transport and barrier function in diarrhea and the impact on therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(6): 687-699. doi:10.1586/eri.12.47.
30. Hove H, Tvede M, Mortensen PB. Antibiotic-associated diarrhoea, *Clostridium difficile*, and short-chain fatty acids. *Scand J Gastroenterol*. 1996;31(7): 688-693. doi:10.3109/00365529609009151.
31. Johansson M.E., Ambort D., Pelaseyed T. et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(22): 3635-41. doi: 10.1007/s00018-011-0822-3.
32. John G., Bartlett M.D. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*. 2002;346(5):334-339.
33. Karlström O. A., Fryklund B., Tullus K., Burman L.G. A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. The Swedish *C. difficile* Study Group. *Clin Infect Dis*. 1998;26(1):141-5.
34. Kiela, P.R., and Ghishan, F.K. 2009. Ion transport in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 25(2):87-91. doi:10.1097/MOG.0b013e3283260900.
35. Kunzelmann K., Mallf M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews*. 2002;82: 245-289.
36. Lakshmi R. Nurin K.S., Vishma G.A., Sreelashmi K.S. Role of lactamases in antibiotic resistance: a review. *Int. Res. J. Rharm*. 2014;5(2):37-40.
37. Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., Staels B. et al. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological Reviews*. 2009;89(1):147-191.
38. Leffler D.A., Lamont J.T. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*. 2009;136:1899-1912.
39. Liu, Q., Yu, Z., Tian, F. et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microb Cell Fact*. 2020;19:23. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1289-4>.

40. Marchelletta R.R., Gareau M.G., McCole D.F. et al. Altered expression and localization of ion transporters contribute to diarrhea in mice with Salmonella-induced enteritis. *Gastroenterology*. 2013;145(6): 1358–1368. e1–4. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.054
41. McCracken V.J., Lorenz R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell. Microbiol.* 2003;3:1-11.
42. McFarland L.V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 2010;16(18): 2202-2222.
43. Murphy J.L., Fenn N., Pyle L. et al Adverse Events in Pediatric Patients Receiving Long-term Oral and Intravenous Antibiotics *Hosp Pediatr.* – 2016. - Vol. 6, № 6. – P. 330-8.
44. Mylonakis E., Ryan E.T., Calderwood S.B. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a review *Arch. Intern. Med.* 2001;161: 525-533.
45. Ng J., Hirota S.A., Gross O. et al. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology*. 2010;139:542-552.
46. Pontier-Bres R., Munro P., Boyer L., Anty R., Imbert V., Terciolo C., et al. *Saccharomyces boulardii* modifies *Salmonella typhimurium* traffic and host immune responses along the intestinal tract. *PLoS One*. 2014;9(8): e103069.
47. Poulsen S M., Kofoed C., Vester B. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. *J Mol Biol.* 2000;304(3):471-81. doi: 10.1006/jmbi.2000.4229.
48. Raheja G., Singh V., Ma K. et al. *Lactobacillus acidophilus* stimulates the expression of SLC26A3 via a transcriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(3): G395-401.
49. Ricanek P., Lunde L., Frye S. et al. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2015;8: 49-67.
50. Roberts M., Hladky S.B., Pickles R.J., and Cuthbert A.W. Stimulation of sodium transport by duramycin in cultured human colonic epithelia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259(3): 1050–8.
51. Rohde C.L., Bartolini V., Jones N. The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Nutr Clin Pract.* 2009;24:33-40.

52. Sanchez-Hurtado K. M. Corretge, E. Mutlu et al. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J. Med. Microbiol.* 2008;57:717-724.

53. Schedl H.P., White D. Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption studies in man. *Gut.* 1966;7(2): 159-163.

54. Shubha, P., Arivarasu, N.A., Tarunmeet, G., Alip, B., Seema, S., Ravinder, K.G., Waddah A.A., and Pradeep K. Dudeja All-trans-retinoic Acid Increases SLC26A3/DRA (Down-regulated in Adenoma) Expression in Intestinal Epithelial Cells via HNF-1 β . *J Biol Chem.* 2015;290: 15066-15077. doi: 10.1074/jbc.M114.566356.

55. Spehlmann, M.E., Dann, S.M., Hruz, P., Hanson, E., McCole, D.F., and Eckmann, L. 2009. CXCR2-dependent mucosal neutrophil influx protects against colitis-associated diarrhea caused by an attaching/effacing lesion-forming bacterial pathogen. *J Immun.* 183(5): 3332-43. doi:10.4049/jimmunol.0900600.

56. Spencer R.C. Clinical impact and associated costs of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41:5-12.

57. Tomas J., Reygner J., Mayeur C., Ducroc R., Bouet S., Bridonneau C., Cavin J.-B., Thomas M., Langella P., Cherbuy C. Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *The ISME J.* ISME J. 2015;9(1): 46-58. doi: 10.1038/ismej.2014.111

58. Viscidi R., Laughon B.E., Yolken R. [et al.] Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 1983;148:93-100.

59. Wiström J., Norrby S.R., Myhre E.B. [et al] Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(1):43-50.

60. Xu J.D., Liu S., Wang W. et al. Emodin induces chloride secretion in rat distal colon through activation of mast cells and enteric neurons. *Br J Pharmacol.* 2012;165(1): 197-207.

РОЗДІЛ 2

ВІДДАЛЕНІ НАСЛІДКИ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ – РИЗИК РОЗВИТКУ ЗАПАЛЕННЯ КИШЕЧНИКА

*Г. М. Толстанова, Ю. В. Голота, Л. В. Закордонець,
Т. В. Довбинчук*

2.1. Склад мікробіоти – клінічні спостереження та експериментальні дослідження

Шлунково-кишковий тракт колонізований мікроорганізмами, кількість яких у 10 разів перевищує загальну кількість усіх клітин організму, а видове різноманіття складає близько 1000 видів [Keubler L. M., 2015; Eckburg P. B., 2005]. Установлено, 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 [Kelder T., 2014]. Тому зміни складу кишкової мікробіоти можуть призводити до порушення регуляції фізіологічного та імунологічного гомеостазу кишечника.

Одним із 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. Втім, недавні дослідження показали, що антибіотики викликають стійкі зміни складу мікробіоти тривалістю не менше місяця після завершення короткого курсу антибіотикотерапії. Так, пероральне введення цефалоспоринового антибіотика цефоперазону індукує порушення мікробіоти сліпої кишки у мишей навіть через 6 тижнів після відміни антибіотика

[Antonopoulos D. A., 2009], пероральне введення клінічно рекомендованих доз кліндаміцину здоровим добровольцям протягом 7 днів викликало стійкі порушення кишкової мікробіоти впродовж наступних 2 років [Jernberg S., 2010]. М. U. Rashid та співавт. [Rashid M. U., 2015] показали, що прийом здоровими добровольцями ципрофлоксацину або кліндаміцину впродовж 10 днів спричиняв зміни фекальної мікробіоти, які тривали навіть 12 місяців після введення препарату.

Наше дослідження показало (табл. 2.1), що якісний і кількісний склад кишкової мікробіоти суттєво змінюється у віддалені терміни після введення антибіотика цефтріаксону [Holota Y., 2019]. На 72 добу (через 56 днів після відміни цефтріаксону) кількість умовно-патогенних та гемолітичних бактерій перевищує контрольні значення у 5,6 та 1,5 раза 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 перевищувала контрольні показники в 1,4 раза. Крім того, спостерігався зсув у напрямку збільшення відносного вмісту лактозонегативних *E. coli*. Слід зазначити, що кількість облигатних анаеробних представників мікробіоти, біфідобактерій та лактобактерій не змінювалась в усі досліджувані терміни. Це свідчить, що внутрішньом'язове введення терапевтичних доз антибіотика не порушує стабільність нормобіоти.

Таблиця 2.1. Якісний та кількісний склад кишкової мікробіоти щурів у віддалені терміни після введення антибіотика цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово, 14 днів)

Мікробіота	Ig КУО/г фекалій			
	інтактні	після відміни цефтріаксону		
		1-й день	14-й день	56-й день
<i>Bifidobacterium</i>	8,86±0,24	8,77±0,24	8,13±0,22	8,80±0,15
<i>Lactobacillus</i>	8,79±0,16	8,18±0,48	8,76±0,06	9,00±0,21

Продовження табл. 2.1

Мікробіота	Ig КУО/г фекалій			
	інтактні	після відміни цефтріаксону		
		1-й день	14-й день	56-й день
<i>Clostridium</i>	1,94±0,06	1,74±0,19	2,20±0,20	3,18±0,48*#
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	5,21±0,27	0,00±0,00*	5,14±0,92	7,04±0,51#
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	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*#
<i>Hemolytic bacteria</i>	4,23±0,23	7,63±0,55*	5,06±0,42	6,34±0,48*

Примітки: 1. * P<0,05 vs. інтактних щурів (контрольні тварини);

2. # P<0,05 vs. 1-й день після відміни цефтріаксону.

Порушення комплексної взаємодії між мікробіотою і макроорганізмом є одним з критичних факторів патогенезу запальних захворювань кишечника [Rarozo D. C., 2017; Kostic A. D., 2014].

У 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 [Hviid A., 2011] та дорослих (середній вік 43,4 року) [Shaw S. Y., 2011]. Установлено, що тривала антибіотикотерапія вірогідно підвищує ризик розвитку виразкового коліту та хвороби Крона у дорослих та дітей [Kronman M. P., 2012; Knoor K. A., 2016]. Однак механізми такого взаємозв'язку залишаються недостатньо з'ясованими.

Кноор К. А. та співавт. [Кноор К. А., 2016] показали, що пероральне введення антибіотиків мишам призводить до транслокації живих симбіотичних бактерій через епітелій товстої кишки, стимулюючи запальні реакції та підвищуючи схильність до більш тяжкого перебігу захворювання. В інших дослідженнях порушення мікробіоти при застосуванні метронідазолу підвищувало запальний тонус кишечника, що характеризувалось порушенням його бар'єрної функції та ускладненням перебігу *C. rodentium*-індукованого коліту [Wlodarska M., 2011]. Ці дослідження підтверджують, що зміни складу кишкової мікробіоти можуть суттєво вплинути на імунітет господаря та стати причиною розвитку запалення в слизовій оболонці кишечника.

Мікробіота кишечника перебуває в тісному метаболічному зв'язку з макроорганізмом, вагома роль у здійсненні якого належить локальному синтезу коротколанцюгових жирних кислот [Mathewson N. D., 2016; Lee W. J., 2014]. Ці метаболіти є важливим енергетичним субстратом для ентероцитів, здатні модулювати імунні процеси, транспорт води і електролітів у шлунково-кишковому тракті [Wong J. M., 2006].

2.2. Коротколанцюгові жирні кислоти – основні метаболіти кишкової мікробіоти

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, коротколанцюгових жирних кислот, коферментів, гормонів

подібних та бактеріостатичних речовин, незамінних амінокислот, пептидів тощо, які визначають фізіологічні функції нормобіоти [van Nuenen M. H., 2004].

Одними з найважливіших метаболітів кишкової мікробіоти, які здійснюють як місцевий, так і системний вплив, є коротколанцюгові жирні кислоти.

Коротколанцюгові жирні кислоти – група насичених органічних кислот, що містять від двох до шести атомів вуглецю. Ацетат, пропіонат і бутират складають 95 % коротколанцюгових жирних кислот, синтезованих в кишечнику, та присутніх в молярному співвідношенні 60:20:20 [den Besten G., 2013]. Загальна концентрація коротколанцюгових жирних кислот максимальна в проксимальному відділі товстої кишки (70–140 мМ), тоді як у дистальному відділі їх концентрації нижчі (20–70 мМ) [Topping D. L., 2001]. Кількість та співвідношення коротколанцюгових жирних кислот залежать від складу та метаболічної активності кишкової мікробіоти, наявності субстратів для їх синтезу та часу кишкового транзиту [Wong J. M., 2006].

Коротколанцюгові жирні кислоти, особливо бутират, слугують важливим джерелом енергії для клітин епітелію кишки, забезпечуючи близько 6–70 % їх енергетичних потреб [den Besten G., 2013]. 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 унормувало цей дефіцит мітохондріального дихання та запобігало їх аутофагії [Donohoe D. R., 2011]. Ацетат і пропіонат, які надійшли у колоноцит, переважно виводяться у кровотік і транспортуються в печінку. Ацетат, за наявності ацетил-КоА синтетази, у цитоплазмі клітин жирової тканини і молочних залоз використовується як субстрат для ліпогенезу та синтезу холестеролу. Показано, що прийом лактулози, яка є субстратом для синтезу коротколанцюгових жирних кислот мікробіотою, підвищує рівень холестеролу в сироватці крові [Jenkins D. J., 1991]. Пропіонова кислота транспортуєть-

ся 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 [Wong J. M., 2006]. Пропіонова кислота також може пригнічувати синтез холестеролу шляхом інгібування активності 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА синтази та 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА редуктази [Bush R. S., 1971].

Проте, коротколанцюгові жирні кислоти є не тільки важливим джерелом енергії, а й виконують різні фізіологічні функції в кишечнику, включаючи регуляцію моторики товстої кишки, рН шлунково-кишкового вмісту та абсорбції електролітів і поживних речовин [Thangaraju M., 2008]. Зниження рН у просвіті кишки за рахунок накопичення кислот пригнічує ріст умовно-патогенної мікробіоти. Це один із важливих механізмів саморегуляції складу й активності нормобіоти. Низький рівень рН підвищує доступність кальцію для зв'язування з вільними жовчаними кислотами та знижує активність бактеріального ферменту 7 α -дегідроксилази, який здійснює перетворення первинних жовчних кислот на вторинні [Thornton J. R., 1981].

Крім того, коротколанцюгові жирні кислоти виступають хімічними месенджерами. Вони відіграють важливу роль у регуляції як локального, так і системного імунітету. Протизапальні функції коротколанцюгових жирних кислот реалізуються шляхом регуляції хемотаксису імунних клітин та вивільнення ними активних форм кисню і цитокінів. Доведено, що бутират пригнічує вивільнення інтерлейкіну (IL) 12 і підвищує – IL-10 у людських моноцитах, стимульованих *Staphylococcus aureus* [Säemann M. D., 2000]. Попередня обробка бутиратом клітин товстої кишки (HT-29 клітини) пригнічує індуковану фактором некрозу пухлин альфа (ФНП- α) ядерну транслокацію прозапального фактора транскрипції каппа-В (NF- κ B) [Yin L., 2001]. Здатність коротколанцюгових жирних кислот пригнічувати NF- κ B знижується в ряду бутират > пропіонат > ацетат у клітинах Colo320DM [Tedelind S., 2007]. Коротколанцюгові жирні кислоти, зокрема пропіонат і бутират, інгібу-

ють 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 коротколанцюгових жирних кислот можуть призводити до накопичення нейтрофілів і посилення запального процесу [Vinolo M. A., 2011]. Ацетат сприяє вивільненню активних форм кисню нейтрофілами мишей [Maslowski K. M., 2009]. Ці дані ілюструють подвійний вплив коротколанцюгових жирних кислот 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 у G1 фазі, інгібуючи проліферацію [Chai F., 2000]. Бутират і пропіонат здатні до епігенетичної регуляції генів через інгібування гістондеацетилаз [Schilderink R., 2013], що призводить до збільшення ацетилювання залишків лізину гістонів та, як результат, впливає на характер експресії багатьох генів.

Коротколанцюгові жирні кислоти сприяють підтриманню бар'єрної функції кишки. Додавання в середовище масляної або пропіонової кислот посилює експресію мРНК MUC2 і секрецію MUC2 лінією келихоподібних клітин людини LS174T [Burger-van Raassen N., 2009]. Бутират збільшує трансепітеліальний електричний опір моношару клітин Caco-2 шляхом прискорення збірки білків щільних контактів. Цей ефект був опосередкований активацією АМФ-залежної протеїнкінази (АМФК) [Peng L., 2009]. 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 у мітоген-активованих протеїнкіназних (МАРК) сигнальних шляхах [Jung T. H., 2015].

Зниження рівня коротколанцюгових жирних кислот у фекаліях є типовим для хворих на запальні захворювання ки-

шечника. Roediger et al. [Roediger W. E., 1980] показали, що колоноцити пацієнтів із виразковим колітом характеризуються зниженням окиснення бутирату, порівняно 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 [Marchesi J. R., 2007], а також високоефективної рідинної хроматографії [Huda-Faujan N., 2010], які показали суттєве зниження рівня ацетату, пропіонату і бутирату в фекаліях пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника, порівняно зі здоровими особами. Ректальне введення коротколанцюгових жирних кислот приводило до помітного поліпшення перебігу захворювання [Harig J. M., 1989]. Інше дослідження з використанням того ж розчину коротколанцюгових жирних кислот для лікування пацієнтів із дивертикулярною хворобою товстої кишки [Guillemot F., 1991] не виявило ендоскопічних чи гістологічних змін впродовж 2 тижнів. Поясненням цього явища може бути пригнічення всмоктування та окиснення коротколанцюгових жирних кислот колоноцитами через низький рівень коензиму А, який необхідний для окиснення жирних кислот. Припускають, що останній може знижуватись у результаті підвищеної продукції сірковмісних сполук кишковою мікробіотою [Roediger W. E., 1993]. Пероральний прийом бутирату (4 г/добу) у вигляді капсули, вкритої кишковорозчинною оболонкою, який тривав 8 тижнів, приводив до полегшення клінічного перебігу та ремісії у 53 % пацієнтів з хворобою Крона, що супроводжувалось зниженням рівнів NF-κB та інтерлейкіну (IL)-1b у слизовій оболонці кишки [Sabatino A. D., 2005]. Введення бутирату знижувало інфільтрацію нейтрофілів за умов експериментального коліту, індукованого декстрансульфатом натрію (DSS), у мишей [Vieira E. L., 2012].

Отже, все більше доказів підтверджують виняткову роль мікробіоти кишечника в підтриманні здоров'я організму та розвитку захворювань. Цей вплив здійснюється через продукцію коротколанцюгових жирних кислот, які є основними бактері-

альними метаболітами під час ферментації харчових волокон. Найвищі рівні коротколанцюгових жирних кислот виявлено в проксимальному відділі товстої кишки, де вони використовуються локально ентероцитами або транспортуються через епітелій кишки в кровотік. Показано, що коротколанцюгові жирні кислоти суттєво впливають на хемотаксис і фагоцитоз та викликають вивільнення активних форми кисню імунними клітинами, мають протизапальну, протипухлинну дію та беруть участь у підтриманні цілісності кишкового бар'єра.

Ми встановили, що на 15 добу експерименту введення цефтріаксону призводило до зниження вмісту оцтової, пропіонової, масляної кислот та загального вмісту коротколанцюгових жирних кислот у фекаліях щурів в 2,9, 13,8, 8,5, 4,8 рази відповідно (рис. 2.1). Вміст валеріанової, ізовалеріанової і капронової кислот після введення цефтріаксону був нижчим від рівня детекції. Ці зміни супроводжувались зниженням значення анаеробного індексу в 4,3 рази та збільшенням відносного вмісту оцтової кислоти.

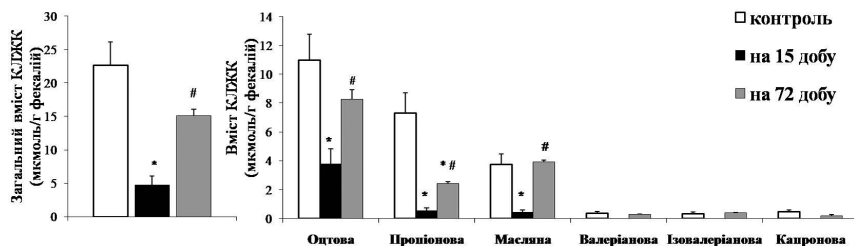


Рис. 2.1. Вміст коротколанцюгових жирних кислот у дистальному відділі товстої кишки щурів на 15 та 72 доби після початку введення цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово, 14 діб); $M \pm m$; $n=12$;
* – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі; # – $p < 0,05$ відносно значень, отриманих на 15 добу.

На 72 добу вміст коротколанцюгових жирних кислот 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, порівняно з контролем. Ці змі-

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

Оскільки коротколанцюгові жирні кислоти є основним енергетичним субстратом для ентероцитів [Thangaraju M., 2008], зниження їх вмісту може призводити до порушення го-меостазу клітин слизової оболонки товстої кишки. Пропорціо-ва і масляна кислоти мають однаковий протизапальний по-тенціал, обумовлений пригніченням транскрипції NF- κ B, тоді як оцтова кислота є значно менш ефективною [Tedelind S., 2007]. Оцтова кислота також може посилювати транскрипцію прозапальних генів та синтез цитокінів [Kendrick S. F., 2010]. Тому збільшення відносного вмісту оцтової кислоти у фекалі-ях може вказувати на прозапальні властивості внутрішньопо-рожнинного середовища товстої кишки щурів після введення цефтріаксону.

З фекаліями виводиться 5–10 % від загальної кількості ко-ротколанцюгових жирних кислот [Wong J. M., 2006], тому вияв-лені зміни характеризують лише частину синтезованих корот-коланцюгових жирних кислот. У товстій кишці коротколан-цюгові жирні кислоти дуже ефективно всмоктуються шляхом пасивної дифузії за участю Na^+ -залежних SMCT та протон-за-лежних MCT мембранних транспортерів [Halestrap A. P., 2013; Ganapathy V., 2008; Thibault R., 2010]. За фізіологічних значень рН вмісту товстої кишки (5,6–6,6) коротколанцюгові жирні кислоти перебувають в аніонній формі, що вказує на важливу роль транспортерів у їх всмоктуванні [Thibault R., 2010].

2.2.1. Роль мембранних транспортерів у процесах обміну коротколанцюгових жирних кислот

Синтез коротколанцюгових жирних кислот здійснюється мікрорганізмами в кишечнику, однак ці метаболіти були вияв-лені в печінці, ворітній вені та системному кровотоці. Відомо,

що майже 90–95 % синтезованих коротколанцюгових жирних кислот всмоктуються і лише 5–10 % виділяються з фекаліями [Wong J. M., 2006]. Всмоктування коротколанцюгових жирних кислот може здійснюватись шляхом дифузії недисоційованих молекул або транспорту аніонів коротколанцюгових жирних кислот за участю мембранних транспортерів. Враховуючи, що pK_a для коротколанцюгових жирних кислот складає близько 4,8, а рН просвіту товстої кишки – близько 6,0 (рН 5,5–6,5), тільки незначний відсоток коротколанцюгових жирних кислот може перебувати в недисоційованому стані [den Besten G., 2013]. Основна частина коротколанцюгових жирних кислот транспортується через мембрани клітин кишкового епітелію за участю H^+ -залежних та Na^+ -залежних транспортерів монокарбонових кислот, MCT і SMCT відповідно, що здійснюють котранспорт аніонів коротколанцюгових жирних кислот з катіонами [Iwanaga T., 2015].

MCT (SLC16) – мембранозв'язані канали, що транспортують лактат, кетонові тіла та інші монокарбонові кислоти, спряжено з протонами (1:1), за градієнтом концентрації. Родина MCT-транспортерів налічує більше 14 підтипів, кожен з яких має дванадцять трансмембранних доменів [Halestrap A. P., 2013]. MCT1-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 коротколанцюгових жирних кислот. MCT2 експресуються переважно на базолатеральній мембрані парієтальних клітин шлунка та не виявляються в інших відділах шлунково-кишкового тракту [Iwanaga T., 2015]. MCT4 і MCT5 також переважно локалізуються в дистальному відділі товстої кишки, тоді як MCT3 – на клітинах тонкої кишки людини. Інші підтипи MCT-транспортерів поширені по різних органах, де беруть участь у транспорті лактату і кетонових тіл, і не виявляються в шлунково-кишковому тракті. Переважна локалізація цих транспортерів на базолатеральній мембрані ентероцитів [68] дозволяє припустити їх важливу роль у транспорті коротколанцюгових жирних кислот у кров.

На відміну від MCT, Na^+ -залежні транспортери коротколанцюгових жирних кислот, SMCT1 (SLC5A8) та SMCT2 (SLC5A12), характеризуються переважною локалізацією на апікальній мембрані клітин та забезпечують всмоктування монокарбонових кислот із просвіту кишки або ниркових каналців [Srinivas S. R., 2005]. Транскрипція SMCT1 у мишей виявляється в дистальних відділах клубової кишки та у всій товстій кишці [Iwanaga T., 2015].

Транспорт коротколанцюгових жирних кислот за участю SMCT1 здійснюється шляхом симпорту з Na^+ в стехіометричному співвідношенні 1:2, що стимулює всмоктування Cl^- та води в кишці [den Besten G., 2013]. Спорідненість SMCT1 до своїх основних субстратів змінюється в порядку: бутират > пропіонат > лактат >> ацетат [Iwanaga T., 2015]. 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 коротколанцюгових жирних кислот [Thangaraju M., 2008].

Транспорт за участю SMCT2 – електронейтральний, зі співвідношенням Na^+ : монокарбонова кислота як 1:1. Експресія SMCT2 була виявлена в тонкій кишці мишей, та не детектувалась у товстій [Srinivas S. R., 2005]. Оскільки рівень коротколанцюгових жирних кислот у тонкій кишці значно нижчий, припускають, що SMCT2 здійснює транспорт ацетату, лактату та інших монокарбонових кислот, які надходять в організм з продуктами харчування [Thangaraju M., 2008].

Отже, механізми транспорту коротколанцюгових жирних кислот у клітини передбачають участь MCT- та SMCT-транспортерів, що опосередковують ефект вказаних кислот на організм.

Проведене нами імуногістохімічне дослідження (рис. 2.2) на парафінових зрізах товстої кишки інтактних щурів (контроль), підтвердило дані інших авторів [Iwanaga T., 2006] про переважну локалізацію MCT1- та MCT4-транспортерів коротколанцюгових жирних кислот на базолатеральній мембрані

колоноцитів, тоді як SMCT1 локалізувався переважно на щіткової облямівці ентероцитів. Також це підтверджує висновок про те, що SMCT1-транспортери відповідають за абсорбцію / всмокутвання коротколанцюгових жирних кислот із просвіту кишечника, а MCT за їх транспортування в кровоносне русло. Через добу після відміни цефтріаксону ми спостерігали підвищення імунореактивності MCT1- та MCT4-транспортерів коротколанцюгових жирних кислот на базолатеральній мембрані ентероцитів та зниження SMCT1-транспортера на щітковій облямівці ентероцитів слизової оболонки товстої кишки щурів (рис. 2.2).

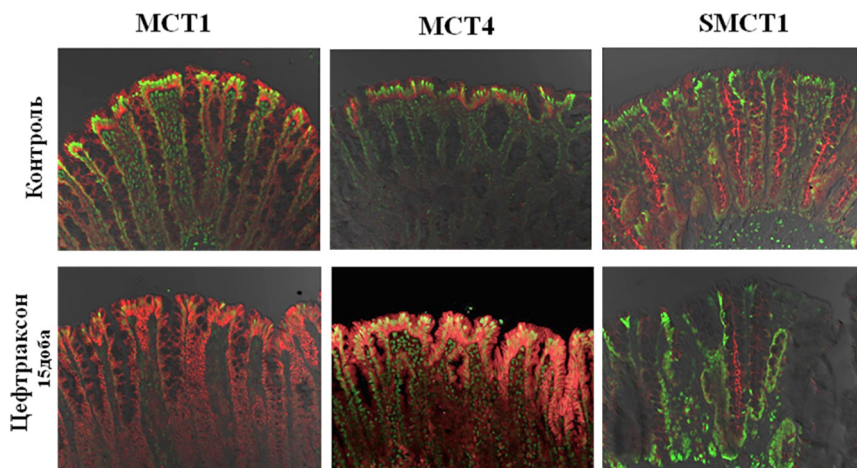


Рис. 2.2. Імунореактивність MCT1, MCT4 і SMCT1 транспортерів коротколанцюгових жирних кислот у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово, 14 діб): імуногістохімія (позитивне забарвлення – червоний колір) $\times 400$; $n=6$.

Cresci та співавт. [Cresci G. A., 2010] показали, що експресія SMCT1-траспортера значно зменшена у мишей-гнотобіотів і відновлюється після колонізації їх кишечника мікробіотою від нормальних мишей.

Як підтвердження, нами було показано, що введення антибіотики, а також порушення експресії транспортерів до коротколанцюгових жирних кислот, призводили до порушень окисно-антиоксидантного балансу в клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів навіть через 8 тижнів після відміни антибіотикотерапії [Holota et al., 2019].

Зазначені процеси є свідченням порушення гомеостазу клітин слизової оболонки товстої кишки щурів та вказують на розвиток прозапальних змін у відповідь на введення цефтріаксону.

2.2.2. Роль рецепторів коротколанцюгових жирних кислот 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 коротколанцюгових жирних кислот [Brown A. J., 2003; Le Poul E., 2003; Nilsson N. E., 2003]. Після цього відкриття різко відновився інтерес до фізіологічної ролі коротколанцюгових жирних кислот та їх рецепторів. GPR41 і GPR43 було перейменовано на FFA3 і FFA2 (free fatty acid), відповідно, на основі їх здатності зв'язуватись із коротколанцюговими жирними кислотами [Stoddart L. A., 2008].

Амінокислотна послідовність FFA2 і FFA3 гомологічна на 43 % [Stoddart L.A., 2008], що свідчить про низьку селективність до лігандів між цими рецепторами. Проте FFA2-рецептори мають вищу спорідненість до коротколанцюгових жирних кислот, ніж FFA3. Сила зв'язування FFA2 людини до різних коротколанцюгових жирних кислот змінюється в ряду $C2 = C3 > C4 > C5 = C1$, тоді як FFA3 – $C3 = C4 = C5 > C2 > C1$ [Milligan G., 2008]. Це означає, що ацетат є набагато сильнішим активатором FFA2, ніж FFA3, тоді як бутират, навпаки, активує FFA3. Карбоксильна група коротколанцюгових жирних кислот є ключовим елементом у зв'язуванні цих ендогенних молекул із рецепторами, оскільки незаряджені естери коротколанцюгових жирних кислот виявились неактивними [Le Poul E., 2003].

Результати вивчення амінокислотної послідовності показали наявність трьох позитивно заряджених амінокислот, які необхідні для розпізнавання коротколанцюгових жирних кислот FFA2 і FFA3-рецепторами: аргінін у трансмембранних доменах 5 і 7 (Arg 5,39; Arg 7,35) та гістидин у четвертому домені (His 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 [Stoddart L.A., 2008].

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 [Brown A. J., 2003; Le Poul E., 2003; Nilsson N. E., 2003]. Передача сигналу від FFA3-рецепторів, спряжена тільки з $G\alpha_{i/o}$ білками [Brown A. J., 2003; Le Poul E., 2003]. Крім того, взаємодія коротколанцюгових жирних кислот з FFA2 рекрутує β -арестин-1 та β -арестин-2 до рецептора, які відповідальні за інтерналізацію FFA2 у клітину та здійснення трансдукції сигналу незалежно від G-білків [Lee S. U., 2013].

Найбільша експресія мРНК FFA2 була виявлена в імунних клітинах, таких як моноцити, В-лімфоцити і поліморфоядерні нейтрофіли [Le Poul E., 2003]. Нещодавні дослідження підтвердили наявність FFA2 на нейтрофілах, еозинофілах [Maslowski K. M., 2009], а також лейкоцитах слизової оболонки кишки [Nøhr M. K., 2013]. 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 патерн експресії, порівняно з FFA2, з найвищою в жировій тканині, селезінці, підшлунковій залозі, кишечнику. Факт присутності FFA3 на імунних клітинах залишається суперечливим [Brown A. J., 2003; Maslowski K. M., 2009].

Дослідження з використанням флуоресцентно мічених L-клітин вказують на високий рівень експресії FFA2 в L-клітинах товстої, а FFA3 – L-клітинах тонкої кишок [Tolhurst G., 2012]. FFA3 частково колокалізуються з гастрином та греліном у шлунку, і повністю – з холецистокініном, глюкозозалежним

інсулінотропним поліпептидом (GIP) і секретинном в проксимальному відділі тонкої кишки, з пептидом тирозин-тирозин (PYY), нейротензином і глюкагоноподібним пептидом 1 (GLP-1) у дистальному відділі тонкої кишки. Градієнт експресії FFA3 у D-клітинах і ентерохромафінних клітинах збільшується в дистальному напрямку [Nøhr M. K., 2013]. Відповідно, зв'язування коротколанцюгових жирних кислот із FFA2 і FFA3-рецепторами ентероендокринних клітин може стимулювати вивільнення GLP-1 [Nøhr M. K., 2013], GLP-2 [Akiba Y., 2015], PYY та GIP [Lin H. V., 2012]. Показано, що агоністи FFA2 стимулюють вивільнення ентерохромафінними клітинами 5-гідрокситриптамину, який, разом з GLP-2, запобігає ушкодженню слизової оболонки кишечника [Akiba Y., 2015]. Отже, FFA2 і FFA3-рецептори беруть участь у регуляції виділення гормонів ентероендокринними клітинами.

Особливий інтерес викликає роль цих рецепторів у регуляції перебігу запалення в кишечнику. Maslowski та ін. [Maslowski K. M., 2009] виявили, що перебіг запалення у кишечнику мишей-гнотобіонтів полегшувався при введенні ацетату та його зв'язуванні з FFA2-рецепторами, тоді як Sina зі співавт. [Sina C. G., 2009] показали, що коротколанцюгові жирні кислоти стимулюють рекрутинг поліморфоядерних нейтрофілів через зв'язування з FFA2, що збільшує пошкодження тканин. У більшості досліджень припускають, що коротколанцюгові жирні кислоти пригнічують вивільнення прозапальних та активують вивільнення лейкоцитами протизапальних цитокінів. Зокрема, пропіонова кислота може індукувати вивільнення протизапального інтерлейкіну-10 із регуляторних Т-клітин через FFA2-опосередкований механізм [Smith P. M., 2013]. Миші, нокаутовані за FFA2 та FFA3, не рекрутували Т-хелпери 1 на моделі ректального запалення [Kim M. H., 2013]. З погляду клітинної сигналізації, ацетат і пропіонат, але не бутират [Le Poul E., 2003; Maslowski K. M., 2009], підвищують концентрацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} у поліморфоядерних нейтрофілах через активацію FFA2 і $\text{Ca}_{q/11}$. Поліморфоядерні нейтрофіли потребують кальцію для хемо-

таксису 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 у хемотаксисі. Масляна кислота пригнічує продукцію АФК у нейтрофілах, стимульованих N-форміл-Мет-Лей-Фен, тоді як оцтова – активує [Vinolo M. A., 2009]. Макрофаги, що не мають FFA2, не виробляють АФК [Vieira A. T., 2015]. Отже, ацетат і пропіонат стимулюють, а бутират пригнічує різні функції імунних клітин. Це може бути поясненням суперечливих результатів щодо використання сумішей коротколанцюгових жирних кислот для лікування запальних захворювань кишечника.

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 [Priyadarshini M., 2015]. Існують також переконливі докази наявності FFA2 на адипоцитах [Brown A. J., 2003; Le Poul E., 2003]. Наявність мРНК FFA3 показана в жировій тканині та клітинних лініях адипоцитів [Brown A. J., 2003]. Доведено, що коротколанцюгові жирні кислоти гальмують ліполіз. Цей ефект відсутній у FFA2-нокаутованих мишей [Ge H., 2008].

Експресія FFA3 виявлена також на клітинах нервової системи. Припускають, що коротколанцюгові жирні кислоти можуть діяти через FFA3 в якості модулятора симпатичної регуляції енергетичного обміну. FFA3 експресується як превертебральними, так і паравертебральними гангліями [Nøhr M. K., 2015]. FFA3-нокаутовані миші мають нижчу частоту серцевих скорочень в спокої, тоді як введення пропіонату мишам контрольної групи може підвищувати частоту серцевих скорочень. FFA3 також експресується в гангліях ентеаральної нервової системи [Nøhr M. K., 2013]. Фізіологічна функція FFA3 у цих гангліях досі не описана.

Отже, FFA2 (GPR43) та FFA3 (GPR41) рецептори специфічно активуються коротколанцюговими жирними кислотами,

які є продуктами метаболізму мікробіоти кишечника. Втім, наявність FFA2 і FFA3 на панкреатичних β -клітинах, FFA3 на нейронах, і FFA2 на лейкоцитах і адипоцитах свідчить, що біологічна роль цих рецепторів, ймовірно, виходить за рамки регуляції виділення пептидних гормонів ентероендокринними клітинами кишечника. Ці дані вказують на важливу роль коротколанцюгових жирних кислот у підтриманні гомеостазу не тільки шлунково-кишкового тракту, а й всього організму.

Ми показали імунореактивність FFA2-рецепторів на келихоподібних клітинах та поверхневих ентероцитах слизової оболонки товстої кишки щурів. Після введення цефтріаксону впродовж 14 днів імунореактивність FFA2 знижувалась. Результати вестерн-блот аналізу показали зниження рівня FFA2 навіть на 72 добу експерименту (56 днів після відміни цефтріаксону) (рис. 2.3). FFA3-рецептори, на відміну від FFA2, мають вищу спорідненість до масляної кислоти [Hudson B. D., 2012] та експресуються переважно в кишечнику, жировій тканині, клітинах підшлункової залози [Brown A. J., 2003; Maslowski K. M., 2000].

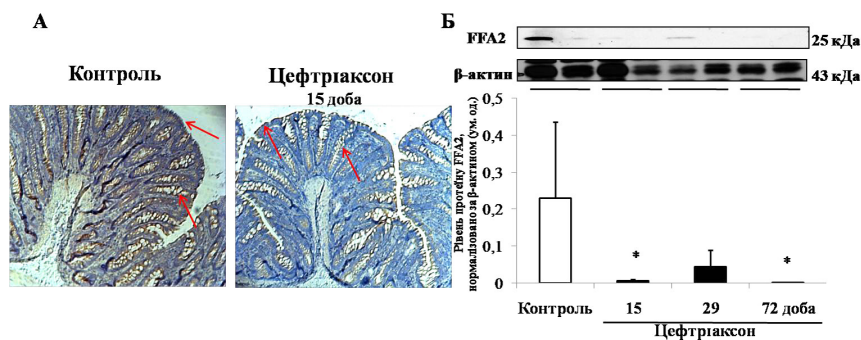


Рис. 2.3. Рівень FFA2-рецепторів коротколанцюгових жирних кислот у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово, 14 днів): А – імунгістохімія, FFA2-позитивне забарвлення – коричневий колір (стрілками вказана локалізація), $\times 100$; Б – Вестерн-блот; $M \pm m$; $n=16$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Результати наших досліджень показали, що за умов норми FFA3-рецептори локалізуються на поверхневих ентероцитах товстої кишки щурів, келихоподібних клітинах і нейронах ентеральних плевтів, що відповідає результатам Nøhr зі співавт. [Nøhr M. K., 2013]. Рівень FFA3-рецепторів після введення цефтріаксону знижувався на 15 добу (1 доба після відміни антибіотика) експерименту, проте на 29 та 72 доби статистично вірогідно не відрізнявся від контрольних значень (рис. 2.4).

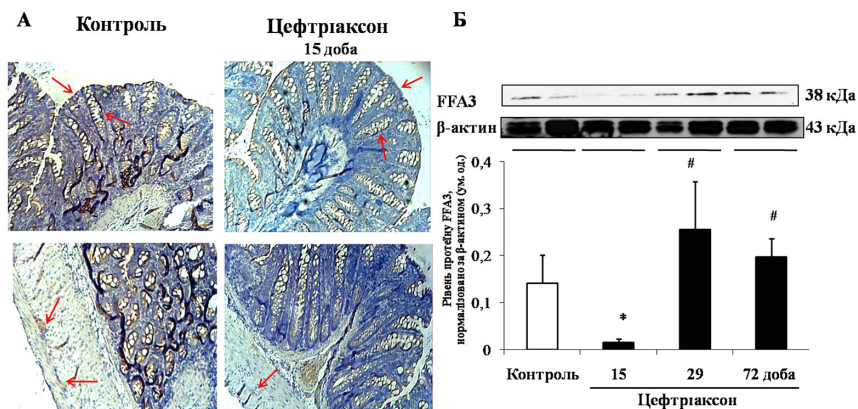


Рис. 2.4. Рівень FFA3-рецепторів коротколанцюгових жирних кислот у слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово, 14 діб):

А – імуногістохімія, FFA3-позитивне забарвлення – коричневий колір (стрілками вказана локалізація) $\times 100$; Б – вестерн-блот; $M \pm t$; $n=16$; * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі, # – $p < 0,05$ відносно показників, отриманих на 15 добу.

Отже, введення антибіотика широкого спектра дії цефтріаксону викликає суттєві та тривалі зміни концентрації коротколанцюгових жирних кислот 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.

2.3. Бар'єрна функція кишечника та механізми її порушення

Величезна поверхня епітелію слизової оболонки шлунково-кишкового тракту виконує спеціалізовані функції травлення, всмоктування і здійснює виділення. Ці процеси повинні співіснувати з одночасною необхідністю забезпечити бар'єр щодо мікроорганізмів, які розщеплюють неперетравлені речовини в просвіті кишки, та потенційних вірусних, бактеріальних і еукаріотичних патогенів [McGuckin M. A., 2011]. Результатом спільної симбіотичної взаємодії клітин епітелію шлунково-кишкового тракту та мікробіоти є формування складної специфічної структури – приепітеліального слизового бар'єра кишечника, який складається зі слизу, секретованого келихоподібними клітинами, молекул секреторного IgA, нормальної мікробіоти та її метаболітів і захищає слизову оболонку від деградації, фізичної та хімічної агресії, адгезії патогенних мікроорганізмів, дії бактеріальних та інших токсинів [McGuckin M. A., 2001; Viggiano D., 2015].

Товщина слизового шару в різних відділах шлунково-кишкового тракту відрізняється – від 150–300 мкм у тонкій кишці до 700 мкм у шлунку і товстій кишці [McGuckin M. A., 2001]. На поверхні слизової оболонки товстої кишки слиз формує два шари: внутрішній шар, позбавлений мікробіоти, і зовнішній – колонізований мікроорганізмами [Ge H., 2008].

Порушення слизового бар'єра може відігравати важливу роль у патогенезі запальних захворювань кишечника, зокрема виразкового коліту [Sun J., 2016; Johansson M. E., 2013]. Роль слизу в патогенезі запальних захворювань кишечника наочно продемонстровано на моделі MUC2-нокаутованих мишей, у яких спонтанно розвивається тяжка форма коліту [Sluis V., 2006]. Руйнування слизового бар'єра дозволяє бактеріям контактувати безпосередньо з епітелієм [Johansson M. E., 2014]. 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 [Johansson M. E., 2013; Luissint A. C., 2016].

Гіпоксія і, відповідно, розвиток оксидативного стресу, з наступною активацією редокс-чутливих транскрипційних факторів (ці зміни ми спостерігали після антибіотикотерапії цефтріаксоном [Holota Y. et al., 2019]), призводять до порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єра на ранніх стадіях розвитку запальних захворювань кишечника [Tolstanova G., 2012].

У наших дослідженнях після відміни введення цефтріаксону (14 діб, 300 мг/кг внутрішньом'язово) підвищувався вміст ТБК-активних сполук, що супроводжувалося дисбалансом активності ферментів антиоксидантного захисту, зниженням вмісту білкових SH-груп у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Ці зміни призводили до зсувів у біосинтетичних процесах клітин слизової оболонки товстої кишки, зокрема, активації редокс-чутливих транскрипційних факторів Egr-1 та Sp-1. Egr-1 та Sp-1 є редокс-чутливими транскрипційними факторами ранньої відповіді, які беруть участь у регуляції метаболізму, росту, диференціювання, ангіогенезу і апоптозу [Ryu H., 2003; Pagel J. I., 2012]. Також ми встановили підвищення рівня транскрипційного фактора HIF1 α , чутливого до гіпоксії. Оскільки запалення та гіпоксія – це взаємопов'язані процеси [Campbell E. L., 2014], отримані нами дані свідчать про прозапальні зміни в слизовій оболонці товстої кишки щурів у віддалені терміни після антибіотикотерапії на фоні порушення метаболічної активності мікробіоти. Дослідження на поверхневих колоноцитах встановили, що індуковане гіпоксією підвищення HIF1 α та циклооксигенази COX-2 позитивно корелювало зі збільшенням експресії мРНК MCT1 та MCT4-транспорттерів коротколанцюгових жирних кислот [Dengler F., 2015].

Більше того, введення цефтріаксону призводило до активації ERK1/2 сигнального каскаду на тлі зниження активності

p38 мітоген-активованих протеїнкіназних шляхів. Активація ERK1/2 може бути пов'язана з підвищеним рівнем активних форм кисню [Chen C. A., 2012]. Крім того, коротколанцюгові жирні кислоти можуть також викликати залежне від часу фосфорилування ERK1/2 через зв'язування з FFA2 і FFA3 рецепторами [Le Poul E., 2003]. Активовані MAP-кінази каталізують фосфорилування численних субстратних білків, включаючи фактори транскрипції, протеїнкінази і фосфатази, а також інших функціональних білків [Chang L., 2001].

p38 MAP-кінази регулюють клітинну відповідь на стрес, а також мають важливе значення під час розвитку запалення [Cuenda A., 2007]. Показано, що функції p38 в окремих тканинах відрізняються [Otsuka M., 2010], що необхідно враховувати для розуміння ролі p38 при різних захворюваннях. Миші, в яких в ентероцитах специфічно інактивована p38, більш сприйнятливі до розвитку коліту, викликаного декстрансульфатом натрію (DSS) або 2,4,6-тринітробензилсульфоною кислотою (TNBS) [Otsuka M., 2010; Gupta J., 2014]. 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 зниженням у слизовій оболонці кишечника кількості клітин, які продукують слиз [Otsuka M., 2010].

Виявлене нами підвищення фосфорилування ERK1/2 після введення цефтріаксону 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 інактивзації p38 у клітинах епітелію кишечника. Варто зазначити, що введення пробіотика VSL#3 усувало ці зміни та приводило до зниження епітеліальної проникності [Gupta J., 2014]. Ці дані підтверджують участь мікробіоти в підтриманні кишкового гомеостазу шляхом регуляції активності MAP-кіназних шляхів.

Для дослідження віддалених змін у стані кишкового бар'єра після введення антибіотика цефалоспоринового ряду ми провели комплексні дослідження (рис. 2.5), які вперше дозволили розкрити молекулярний механізм залежності між змінами у транспортно-рецепторній системі коротколанцюгових жирних кислот організму господаря і метаболічній активності мікробіоти, як чинників підвищення схильності до запальних захворювань кишечника, зумовлених антибіотиками. До нас усі спроби розкрити механізм підвищеної схильності до запальних захворювань кишечника, асоційованих із антибіотикотерапією, мали певні обмеження, зокрема такі:

1) дослідження проводилися із використанням коктейлю антибіотиків, що не відтворює клінічної ситуації застосування монотерапії [Knoor et al., 2016; Scott N. A., 2018];

2) аналіз ефектів, зумовлених антибіотикотерапією, оцінювали відразу після відміни антибіотиків, що не дозволяє робити висновки про віддалені наслідки [Knoor K. A., 2016; Wlodarska M., 2011];

3) досліджували непрямий ефект антибіотиків, вивчаючи наслідки антибіотикотерапії на нащадках, народжених від матерів, яким згодовували антибіотики для моделювання дисбіозу [Arnal M. E., 2015].

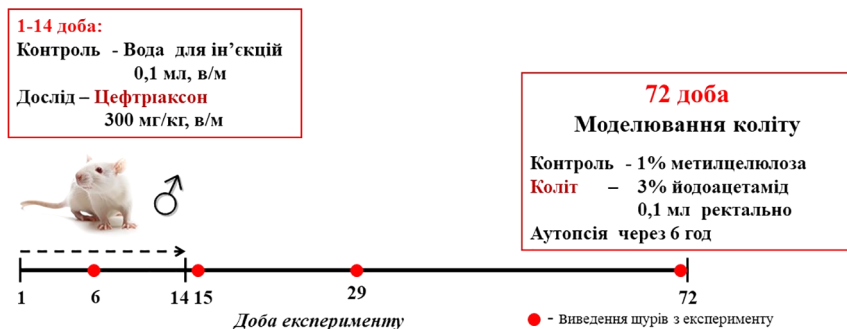


Рис. 2.5. Схематичне зображення дизайну експерименту на щурах для дослідження віддалених змін у стані кишкового бар'єра після введення антибіотика цефалоспоринового ряду цефтріаксону.

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 тощо), які локалізовані на апікальній мембрані ентероцитів. Головним секреторним муцином тонкої і товстої кишок є MUC2 [McGuckin M. A., 2011]. 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 основні структури. Типовою особливістю молекул О-гліканів MUC2 людини є приєднання сіалової кислоти в C6 положенні GalNAc. У результаті гілка C6 термінується. Олігосахарид послідовно подовжується в положенні C3 залишками N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) та галактози (Gal) [Larsson J. M., 2009]. Глікопротеїни кишечника щурів містять 4 типи основних 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- [Karlsson N. G., 1997].

Глікани складають 60–80 % маси молекули муцину. Вони покривають білкову основу і тим самим захищають муцини від деградації протеолітичними ферментами та впливають на їх гель-формуєчі властивості. Термінальні олігосахариди є потенційними лігандами для мікробних адгезинів та поживним субстратом для симбіотичних бактерій зовнішнього шару слизу [McGuckin M. A., 2011].

Важливість правильного глікозилювання муцинів була показана на моделях мишей із нокаутуваними генами глікозилтрансфераз. Так, миші, нокаутовані по β 1,3-N-

ацетилглюкозамінілтрансферазі (С3GnT), яка приєднує залишок GlcNAc до Tn антигену (GalNAc α 1-S/T) з утворенням основної структури III типу, стають більш сприйнятливими до розвитку запалення товстої кишки, зокрема на моделі коліту, індукованого декстрансульфатом натрію (DSS) [An G., 2007]. У мишей, нокаутованих по β 1,3-галактозилтрансферазі (C1GalT1, або T-синтаза) в дистальних відділах товстої кишки спонтанно розвивається коліт [Fu J., 2011].

У термінальному положенні олігосахаридів муцинів локалізуються залишки фукози, сіалових кислот та сульфатовані моносахариди [Larsson J. M., 2009]. Сульфатування та сіалування олігосахаридів муцинів забезпечує додаткову стійкість слизу до руйнування бактеріальними глікозидазами [Corfield A. P., 1992; Shirazi T., 2000]. Тому не тільки кількість, а й 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 [Sun J., 2016].

Рівень глікопротеїнів поверхневого слизу можна визначати за рівнем зв'язування реактиву Фоліна з білковою частиною молекули [Романенко Е. Г., 2012], що дає інформацію про концентрацію білка в складі муцини. Інший метод – це Шиф-реакція на PVDF-мембрані [Akiba Y., 2000]. Цей метод дозволяє детектувати гліканову частину глікопротеїнів.

Введення цефтріаксону впродовж 14 діб не впливало на концентрацію глікопротеїнів поверхневого слизу тонкої кишки щурів в усі досліджувані терміни. В товстій кишці достовірних змін концентрації глікопротеїнів на 15 та 29 доби також не спостерігалось. Однак на 72 добу експерименту цей показник зменшувався в 1,3 раза відносно показників у контрольній групі (р. з реактивом Фоліна). Шиф-реакція виявила зниження відносного вмісту глікопротеїнів в 1,9 раза на 72 добу експерименту. Таким чином, зміни у складі слизового бар'єра пов'язані не лише із зниженням загальної кількості глікопротеїнів, а й зі змінами їх вуглеводного компонента (рис. 2.6).

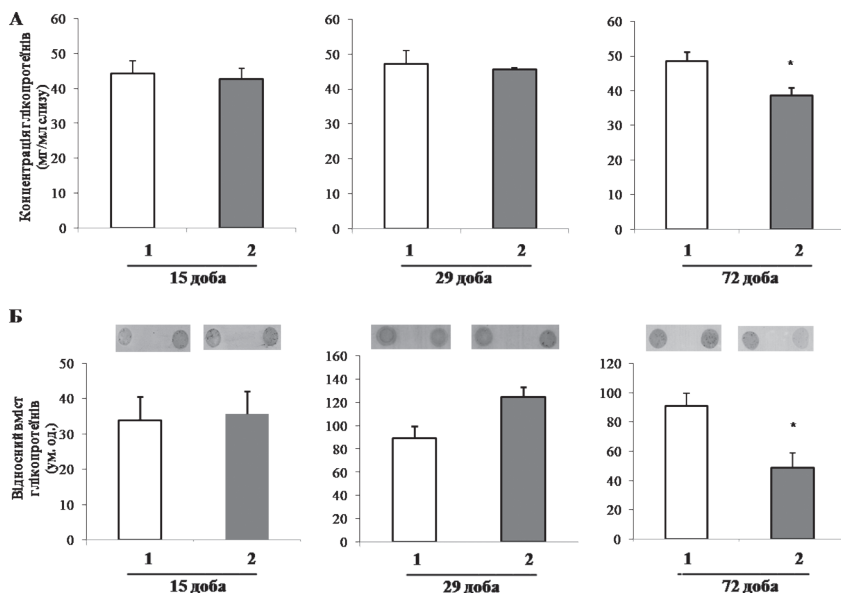


Рис. 2.6. Рівень глікопротеїнів поверхневого слизу товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтріаксону (300 мг/кг внутрішньом'язово, 14 діб): А – реакція з реактивом Фоліна після виділення сульфосаліциловою кислотою; Б – метод Шиф-реакції на PVDF-мембрані; М±m; 1 – контроль (n=12), 2 – цефтріаксон (n=12); * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Відомо, що резистентність слизової оболонки кишечника значною мірою залежить не тільки від вмісту глікопротеїнів, а й від складу та довжини їх бокових вуглеводних ланцюгів, які захищають поліпептиди від протеолізу, а також обмежують проникнення макромолекул, включаючи бактеріальні, токсини, до клітин епітелію [McGuckin M. A., 2009].

Тому доцільно оцінювати не лише загальну кількість глікопротеїнів поверхневого слизу, а й якісний склад їх вуглеводних залишків, зокрема вміст гексоз, гексозамінів, фукози та сіалових кислот. Зменшення вмісту глікопротеїнів супроводжувалось якісними змінами структури олігосахаридних ланцюгів молекул глікопротеїнів, зокрема зниженням концентрації гексоз і

фукози в 1,2 та 3,1 раза відповідно. Концентрація гексозамінів, які локалізуються переважно в основній частині олігосахаридів муцину [Larsson J. M., 2009], не змінювалась на 72 добу експерименту, однак рівень сіалових кислот, які займають термінальне положення [Karlsson N. G., 1997], збільшувався в 1,5 раза.

Виявлені зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни цефтріаксону 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 [Campbell B. J., 2001] (рис. 2.7).

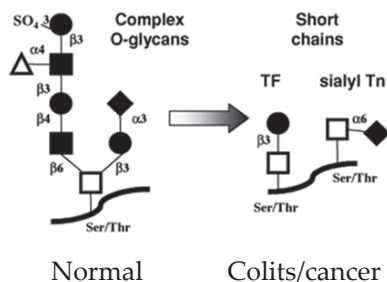


Рис. 2.7. Структура олігосахаридних ланцюгів молекул глікопротеїнів слизу товстої кишки в нормі та при розвитку проканцерогенних змін (діаграма відтворена із публікації [Campbell B. J., 2001]).

Відсутність змін у концентрації гексозамінів на фоні зниження вмісту глікопротеїнів може свідчити про вкорочення олігосахаридної частини молекул. Показано [Campbell B. J., 1995], 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 (Gal β 1-3GalNAc α -), який є основною 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 фукозилування глікопротеїнів [Okada Y., 1994].

Підвищення сіалування муцинів є типовим при запальних захворюваннях кишечника [Sun J., 2016]. У складі слизу товстої кишки пацієнтів із виразковим колітом виявлялось підвищення вмісту коротких O-зв'язаних антигенів, таких як сіаліл Tn (сіаліл- α 2,6N-ацетилгалактозамін α -зв'язаний з серином або треоніном основи) [Karlen P., 1998].

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. Виявлені зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни цефтріаксону свідчать про вкорочення вуглеводних ланцюгів молекули глікопротеїну та передчасне їх термінування залишками сіалових кислот [Campbell E. L., 2014; Okada Y., 1994]. Подібний характер змін складу слизу є типовим під час розвитку запальних захворювань кишечника. Описані зміни можуть призводити до порушення в'язкості слизу та зниження ефективності слизового шару [Johansson M. E., 2014; Campbell E. L., 2014], що, в свою чергу, є причиною порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єра.

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 запальними захворюваннями кишечника [Herszényi L., 2000; Koelink P. J., 2014]. Ми припустили, що порушення слизового

бар'єра може індукувати прозапальні зміни в слизовій оболонці товстої кишки. Ряд досліджень показав, що експресія матриксних металопротеїназ ММП-2 і ММП-9 посилюється під час запалення слизової оболонки товстої кишки пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника та корелює з активністю хвороби [Stallmach A., 2000; von Lampe B., 2000]. Порушення гомеостазу слизової оболонки товстої кишки щурів підтверджувалось збільшенням протеолітичної активності ММП-9 та зниженням – ММП-2 після введення цефтріаксону на 72 добу експерименту (рис. 2.8).

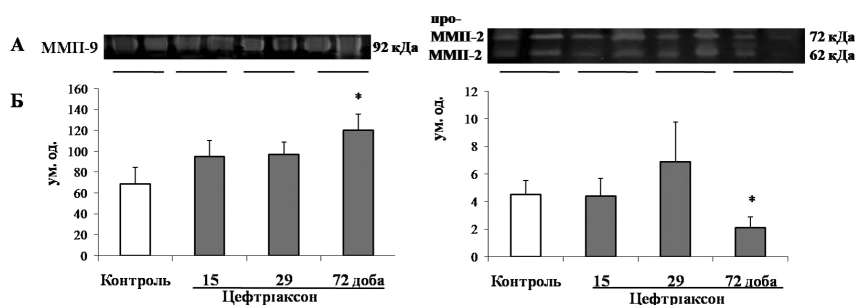


Рис. 2.8. Желатиназна активність ММП-9 та ММП-2 у слизовій оболонці товстої кишки щурів у різні терміни після введення цефтріаксону; $M \pm m$; $n=16$; А – електрофореграма після детекції активності ММП, Б – результати денситометрії; * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Згідно з літературними даними, ММП-9 є медіатором запальної реакції і пошкодження тканин, оскільки надмірна експресія погіршує загоєння виразок епітелію кишечника [Castaneda F. E., 2005] та збільшує виділення прозапальних цитокінів [Liu H., 2013]. ММП-9^{-/-} миші характеризуються зниженою інтенсивністю запалення та меншим ушкодженням слизової оболонки за умов експериментального коліту, тоді як ММП-2^{-/-} миші були високочутливими до коліту, викликаного як декстран сульфатом натрію, так і бактеріями *Salmonella enterica serovar Typhimurium* [Garg P., 2009].

Крім того, показано, що ММП-2⁺ миші характеризуються порушенням функціонування кишкового бар'єра та підвищеною проникністю епітелію кишечника [Garg P., 2006]. Отже, ММП-2 захищають від розвитку запальної відповіді під час коліту. Це дозволяє припустити, що підвищення активності ММП-9, та зниження активності ММП-2 у слизовій оболонці товстої кишки щурів підвищуватиме сприйнятливність до розвитку запальних захворювань кишечника у віддалені терміни після введення цефтріаксону. Варто зазначити, що ці зміни розвиваються на фоні порушення функціонування слизового бар'єра товстої кишки щурів після антибіотикотерапії.

Виходячи з отриманих результатів щодо розвитку дисбіотичних змін мікробіоти товстої кишки, порушення стану слизового бар'єра та підвищення активності матриксних металопротеїназ у віддалені терміни після введення цефтріаксону ми припустили, що ці зміни можуть свідчити про порушення інтегративної цілісності епітеліального бар'єра.

Tulstrup зі співавт. [Tulstrup M. V., 2015], 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 тварин одразу після курсу введення антибіотиків. Навпаки, введення метронідазолу призводило до збільшення концентрації FITC-декстрану, порівняно з контролем. Тому автори зробили висновок, що епітеліальна проникність залежить від класу антибіотиків. Наші дослідження показали, що проникність епітелію товстої кишки щурів не змінюється одразу після відміни цефтріаксону, однак зростає на 72 добу експерименту (рис. 2.9 А). Це супроводжувалось посиленням транслокації мікроорганізмів у системний кровотік (рис. 2.9 Б).

Транслокація мікроорганізмів може здійснюватись трансцелюлярним і парацелюлярним шляхами [Balzan S., 2007] та є нормальним явищем, яке відбувається у здорових людей [Nikkari S., 2001]. Припускають, що такий фізіологічний механізм дозволяє підтримувати толерантність імунної системи до

нормобіоти кишечника [Дьяченко А. Г., 2016]. Однак надмірна проліферація бактерій, пошкодження кишкового бар'єра та системна імуносупресія можуть призводити до бактеріємії. Зокрема, посилення мікробної транслокації внаслідок пошкодження кишкового бар'єра асоціюється з розвитком септичних ускладнень та системного запалення [MacFie J., 1999; Potgieter M., 2015; de Jong P. R., 2016]. Отже, збільшення кількості бактерій у крові порталної вени щурів у віддалені терміни після введення цефтріаксону, яке ми спостерігали, свідчить про дисрегуляцію взаємодії між клітинами епітелію, імунними клітинами власної пластинки слизової оболонки та мікробіоти кишечника.

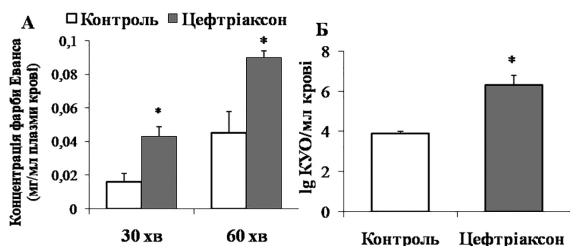


Рис. 2.9. Проникність епітелію товстої кишки (А) та загальна кількість мікроорганізмів (lg КУО/ мл) у крові щурів (Б) на 72 добу від початку введення цефтріаксону; $M \pm m$; $n=16$; * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Отримані результати збігаються з даними, отриманими Кноор та співавт. [Кноор К. А., 2016], 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 кишкового бар'єра з наступною транслокацією бактерій через стінку кишки вважають одним із основних факторів патогенезу запальних захворювань кишечника [Kaser A.,

2010], оскільки надмірна активація імунної системи нормальною резидентною мікрофлорою спричиняє поступове виснаження місцевого імунітету з наступним спотворенням імунної відповіді на подразники різного генезу. Отримані результати вказують на те, що антибіотикотерапія може впродовж тривалого часу впливати на функціонування епітеліального бар'єра кишечника та підвищувати сприйнятливість до розвитку запальних захворювань кишечника.

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 у 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 цефтріаксону.

Порушення слизового бар'єра 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 IL-1, IL-6, IL-8, фактор некрозу пухлин альфа (ФНП-а), інтерферон гамма (ІФН γ), і хемокіну CCL2, що призводить до рекрутингу й активації лейкоцитів [Ley K., 2007]. Нейтрофіли першими відповідають на ушкодження слизового бар'єра та виникнення трансепітеліального градієнта мікробних і клітинних хемоатрактантів. Активовані нейтрофіли виділяють ряд протеаз, які мають потенційний вплив на функціонування епітеліального бар'єра шляхом зміни структури і функцій епітеліальних міжклітинних контактів. У результаті, дисфункція епітеліального бар'єра може підтримувати патологічне запалення слизової оболонки [Luissint A. C., 2016]. Підтвердженням цього є виявлена нами дегрануляція опасистих клітин у товстій кишці щурів, яким вводили цефтріаксон. Однак це не єдиний фактор, який робить внесок у розвиток

запальних захворювань кишечника. Родичі пацієнтів з хворобою Крона мали збільшену проникність епітелію кишечника, яка не супроводжувалась розвитком запалення, що підтверджує поліетиологічність запальних захворювань кишечника [Luissint A. C., 2016].

Оскільки порушення кишкового бар'єра з наступною транслокацією бактерій вважають одним із основних факторів патогенезу запальних захворювань кишечника [Kaser A., 2008], ми припустили, що вищенаведені зміни підвищуватимуть чутливість до дії ульцерогенних чинників. Для підтвердження цього припущення у щурів, яким попередньо вводили цефтріаксон, на 72 добу експерименту викликали експериментальний коліт (див. рис. 2.5). Встановлено, що введення цефтріаксону інтенсифікує набряк товстої кишки, що проявлялось збільшенням її маси та поперечного перерізу, порівняно з групою коліту (рис. 2.10).

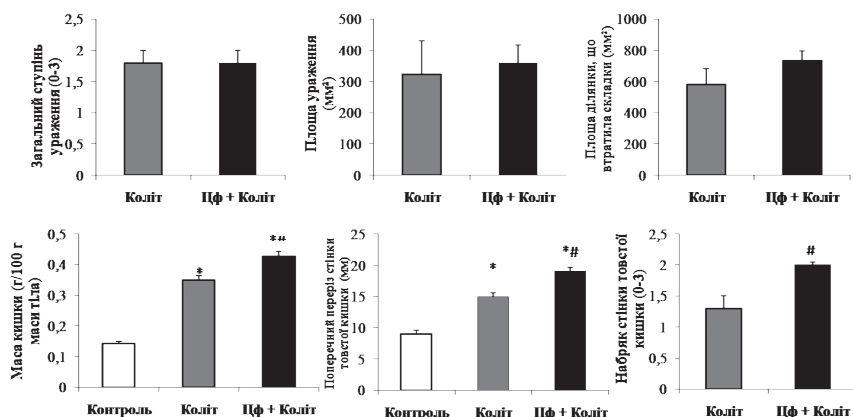


Рис. 2.10. Макроскопічні показники перебігу експериментального коліту через 56 днів після відміни цефтріаксону (72 доба експерименту): загальний ступінь ураження, площа ураження, площа ділянки, що втратила складки, маса кишки, поперечний переріз стінки товстої кишки, набряк стінки товстої кишки; контроль (n=5); Цф – цефтріаксон (300 мг/кг внутрішньом'язово, 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; # $p < 0,05$ – порівняно з групою коліту.

Гістологічно ці зміни характеризувалось зниженням товщини слизової оболонки товстої кишки і висоти ентероцитів, порівняно з групою коліту.

Отже, проведене нами дослідження показало, що попереднє введення цефтріаксону 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 цефтріаксон-індукованого зменшення товщини слизової оболонки товстої кишки, глибини крипт, висоти ентероцитів, площі перерізу ядер ентероцитів, гіпертрофії келихоподібних клітин та дегрануляції опасистих клітин слизової оболонки товстої кишки щурів у віддалені терміни після відміни антибіотика (72 доба експерименту).

Отримані результати узгоджуються з проведеним недавно пропективним клінічним дослідженням впродовж чотирирічного періоду [Hashash J. G., et al. (2015)], показало, що прийом антибіотиків, пацієнтами із запальними захворюваннями кишечника, як у схемах терапії цих захворювань, так і з інших причин, супроводжувався тяжчим 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 підвищенням активності захворювання у пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника.

Епітелій кишечника є тканиною, яка найшвидше самооновлюється в організмі людини. Цей процес регулюється популяцією кишкових мультипотентних стовбурових клітин, які знаходяться на дні крипт. Функціонування та диференціювання стовбурових клітин залежить від сигналів мікрооточення [Leedham S. J., 2005], яке залишається суттєво зміненим упродовж тривалого часу після антибіотикотерапії [Dethlefsen L., 2011]. У відповідь на такий вплив у слизовій оболонці товстої кишки можуть відбуватись структурні зміни: змінюються тов-

щина слизової оболонки, глибина крипт, висота ентероцитів.

Відомо, що зміни складу кишкової мікробіоти можуть істотно впливати на перебіг запалення слизової оболонки кишечника [Ott S. J., 2004; Devkota S., 2012]. Зниження кількості резидентних мікроорганізмів (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes* і *Firmicutes*), які зазвичай захищають кишковий епітелій від інвазії патогенів, а також збільшення умовно-патогенних бактерій (наприклад, *Escherichia coli*), може сприяти запаленню через їх здатність до адгезії і проникнення в епітеліальні клітини кишечника з подальшим виділенням прозапальних цитокінів [Sartor R. B., 2008].

Отже, підвищення сприйнятливості шурів до розвитку експериментального коліту, яке ми спостерігали, є наслідком порушення інтегративної цілісності кишкового бар'єра у віддалені терміни після антибіотикотерапії.

Крім того, у шурів з експериментальним колітом після попереднього введення цефтріаксону рівні ФНП- α та ІЛ-10 в сироватці крові були вищими в 1,3 раза, порівняно з групою коліту (рис. 2.11).

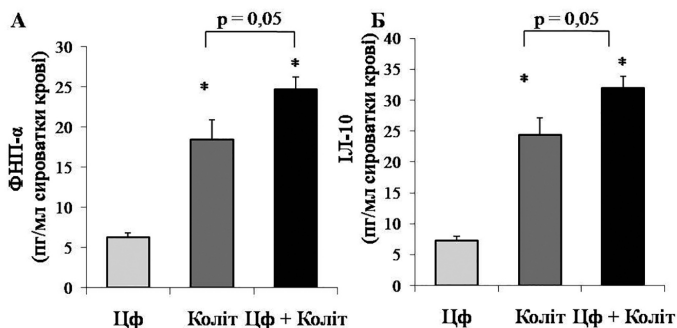


Рис. 2.11. Концентрація ФНП- α (А) та ІЛ-10 (Б) у сироватці крові шурів з експериментальним колітом, індукованим введенням 3 % йодоацетаміду, на 72 добу від початку введення цефтріаксону; Цф – цефтріаксон; коліт – 3 % йодоацетамід 0,1 мл ректально, аутопсія через 6 год; $M \pm m$; $n=15$.

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) свідчать про порушення цього гомеостазу, що є потенційною загрозою розвитку запалення в кишечнику [Wu H. J., 2012]. Одним із механізмів регуляції імунного гомеостазу кишки є продукція цитокінів імунними клітинами, такими як нейтрофіли, макрофаги, дендритні клітини, лімфоцити та опасисті клітини. Тому збалансоване виділення прозапальних (наприклад, ФНП- α , IL-1b, IL-6, IL-12, IL-23) і протизапальних медіаторів (наприклад, трансформуючий фактор росту β , IL-10) є важливим для запобігання розвитку запалення [Okumura R., 2016].

Відомо, що ФНП- α відіграє ключову роль у патогенезі запальних захворювань кишечника [Bradley J. R., 2008]. Цей 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, інфліксимаб) є одним з найефективніших лікарських засобів для лікування запальних захворювань кишечника [Magro F., 2010].

IL-10 є ключовим медіатором підтримки кишкового гомеостазу, що обмежує і в кінцевому підсумку веде до припинення імунних реакцій [Paul G., 2012]. У мишей, нокаутованих за IL-10, спонтанно розвивається ентероколіт, тому їх широко використовують в якості генетичної моделі запальних захворювань кишечника [Kühn R., 1993; Keubler L.M., 2015].

Індуковане попереднім введенням цефтріаксону посилення виділення як прозапального ФНП- α , так і протизапального IL-10, під час експериментального коліту вказує на те, що антибіотикотерапія підвищує сприйнятливість до розвитку коліту за рахунок посилення імунної відповіді до ульцерогенних чинників.

Отже, введення цефтріаксону призводить до віддалених органічних 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 на 72 добу експерименту (рис. 2.12).

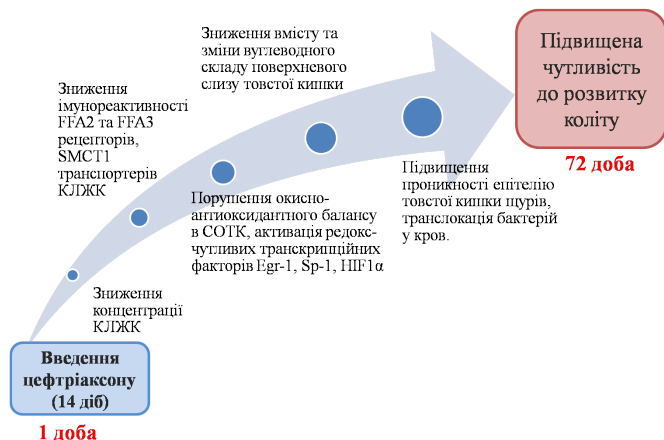


Рис. 2.12. Схема розвитку віддалених органічних змін інтегративної бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки щурів після введення цефтріаксону.

ВИСНОВКИ

Викликані цефтріаксоном зміни концентрації коротколанцюгових жирних кислот 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, NF1α, що призводить до тривалих змін у складі глікопротеїнів слизу і, як результат, підвищення чутливості кишкового бар'єра до ульцерогенних чинників. Порушення бар'єрної функції товстої кишки є основним фактором віддалених наслідків антибіотикотерапії, що підвищує сприйнятливність до розвитку запалення

Список використаних джерел

1. Дьяченко А.Г., Горобченко К.М. Мукозний імунітет і транслокація бактерій. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2016;97(8): 10-16.
2. Романенко Е.Г., Кленина И.А. Способ определения общих гликопротеинов в слюне. Світ медицини та біології. 2012;4: 91-93.
3. Akiba Y., Guth P.H., Engel E. et al. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000;279: 437-447.
4. Akiba Y., Inoue T., Kaji I. et al. Short-chain fatty acid sensing in rat duodenum *J Physiol.* 2015;593(3): 585-599.
5. An G., Wei B., Xia B. et al. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. *J. Exp. Med.* 2007;204(6): 1417-1429.
6. Antonopoulos D.A., Huse S.M., Morrison H.G., Schmidt T.M., Sogin M.L., Young V.B. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect Immun.* 2009;77(6):2367-75. doi: 10.1128/IAI.01520-08
7. Arnal M.E., Zhang J., Erridge C., Smidt H., Lallès J.P. Maternal antibiotic-induced early changes in microbial colonization selectively modulate colonic permeability and inducible heat shock proteins, and digesta concentrations of alkaline phosphatase and TLR-stimulants in swine offspring. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0118092. doi: 10.1371/journal.pone.0118092
8. Balzan S., de Almeida Quadros C., de Cleve R. et al. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007;(4): 464-471.
9. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 2008;214(2): 149-160.
10. Brown A.J., Goldsworthy S.M., Barnes A.A. et al. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem.* 2003;278(13): 11312-11319.
11. Burger-van Paassen N., Vincent A, Puiman P.J. et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J.* 2009;420(2): 211-219.
12. Bush R.S., Milligan L.P. Study of the mechanism of inhibition of ketogenesis by propionate in bovine liver. *Can J Anim Sci.* 1971;51: 121-127.

13. Campbell B.J., Finnie I.A., Hounsell E.F. et al. Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin. *J. Clin. Invest.* 1995;95(2): 571-576.

14. Campbell B.J., Yu L.G., Rhodes J.M. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: A possible role in cancer development. *Glycoconjugate J.* 2001;18(11-12): 851-858.

15. Campbell E.L., Bruyninckx W.J., Kelly C.J., Glover L.E., McNamee E.N., Bowers B.E., et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity.* 2014;40(1):66-77. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.020

16. Castaneda F.E., Walia B., Vijay-Kumar M. et al. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology.* 2005;129(6): 1991-2008.

17. Chai F., Evdokiou A., Young G.P. et al. Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis.* 2000;21(1): 7-14.

18. Chang L., Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(6824): 37-40.

19. Chen C.A., Chen T.S., Chen H.C. Extracellular signal-regulated kinase plays a proapoptotic role in podocytes after reactive oxygen species treatment and inhibition of integrin-extracellular matrix interaction. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2012;237: 777-783

20. Corfield A.P., Wagner S.A., Clamp J.R. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect. Immun.* 1992;60(10): 3971-3978.

21. Cresci G.A., Thangaraju M., Mellinger J.D., Liu K., Ganapathy V. Colonic gene expression in conventional and germ-free mice with a focus on the butyrate receptor GPR109A and the butyrate transporter SLC5A8. *J Gastrointest Surg.* 2010;14(3):449-61. doi: 10.1007/s11605-009-1045-x.

22. Cuenda A., Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;(1773): 1358-1375.

23. de Jong P.R., González-Navajas J.M., Jansen N.J. The digestive tract as the origin of systemic inflammation. *Crit. Care.* 2016;20(1): 279.

24. den Besten G., van Eunen K., Groen A.K. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013;54(9): 2325-2340.

25. Dengler F., Rackwitz R., Benesch F., Pfannkuche H., Gäbel G. Both butyrate incubation and hypoxia upregulate genes involved in the ruminal transport of SCFA and their metabolites. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2015;99(2):379-90. doi: 10. 1111/jpn.12201
26. Dethlefsen L., Relman D.A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(1): 4554-4561.
27. Devkota S., Wang Y., Musch M.W. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10-/- mice. *Nature*. 2012;7405(487): 104-108.
28. Donaldson G.P., Melanie L.S., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14: 20-32.
29. Donohoe D.R., Garge N., Zhang X. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 2011;13(5): 517-526.
30. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728): 1635-1638.
31. Fu J., Wei B., Wen T., Johansson M.E. Loss of intestinal core1-derived O-glycans causes spontaneous colitis. *J. Clin. Invest*. 2011;121(4): 1657-1666.
32. Ganapathy V., Thangaraju M., Gopal E. et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J*. 2008;10: 193-199.
33. Garg P., Ravi A., Bockbrader K. et al. Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. *J. Immunol*. 2006;177(6): 4103-4112.
34. Garg P., Vijay-Kumar M., Wang L. et al. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2009;296(2): G175-184.
35. Ge H., Li X., Weiszmann J. et al. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*. 2008;149(9): 4519-4526.
36. Guillemot F., Colombel J.F., Neut C. et al. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. *Dis Colon Rectum*. 1991;34(10): 861-864.
37. Gupta J., del Barco Barrantes I., Igea A. et al. Dual function of p38 α MAPK in colon cancer: suppression of colitis-associated tumor initiation but requirement for cancer cell survival. *Cancer Cell*. 2014;25(4): 484-500.

38. Halestrap A.P. Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol.* 2013;3(4): 1611-1643.

39. Harig J.M., Soergel K.H., Komorowski R.A. et al. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med.* 1989;320(1): 23-28.

40. Herszényi L., Plebani M., Carraro P. et al. Proteases in gastrointestinal neoplastic disease. *Clin. Chimica. Acta.* 2000;291(2): 171-187.

41. Holota Y., Dovbynchuk T., Kaji I., Vareniuk I., Dzyubenko N., Chervinska T., Zakordonets L., Stetska V., Ostapchenko L., Serhiychuk T., Tolstanova G. The long-term consequences of antibiotic therapy: Role of colonic short-chain fatty acids (SCFA) system and intestinal barrier integrity. *PLoS One.* 2019;14(8):e0220642. doi: 10.1371/journal.pone.0220642. eCollection 2019

42. Huda-Faujan N., Abdulamir A.S., Fatimah A.B. et al. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *Open Biochem J.* 2010;4: 53-58.

43. Hudson B.D., Tikhonova I.G., Pandey S.K. et al. Extracellular ionic locks determine variation in constitutive activity and ligand potency between species orthologs of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *J Biol Chem.* 2012;287(49): 41195-209.

44. Hviid A., Svanström H., Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut.* 2011;60(1): 49-54.

45. Iwanaga T, Takebe K, Kato I, Karaki S, Kuwahara A. Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomed Res.* 2006;27(5):243-54

46. Iwanaga T, Kishimoto A. Cellular distributions of monocarboxylate transporters: a review. *Biomed Res.* 2015;36(5): 279-301.

47. Jenkins D.J., Wolever T.M., Jenkins A. et al. Specific types of colonic fermentation may raise low-density-lipoprotein-cholesterol concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1991;54: 141-147.

48. Jernberg C., Löfmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology.* 2010;156(Pt 11):3216-23. doi: 10.1099/mic.0.040618-0

49. Johansson M.E., Gustafsson J.K., Holmén-Larsson J. et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014;63(2): 281-291.

50. Johansson M.E., Larsson J.M., Hansson G.C. The two mucus layers of colon are organized by the muc2 mucin, where as the out

erlayerisalegislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(1):4659–4665.

51. Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C. et al. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013;10(6): 352–361.

52. Jung T.H., Park J.H., Jeon W.M., Han K.S. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr Res Pract.* 2015;9(4): 343-349.

53. Karlen P., Young E., Brostrom O. et al. Sialyl-Tn antigen as a marker of colon cancer risk in ulcerative colitis: Relation to dysplasia and DNA aneuploidy. *Gastroenterology.* 1998;115(6): 1395–1404.

54. Karlsson N.G., Herrmann A., Karlsson H. et al. 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. *J. Biol. Chem.* 1997;272(43): 27025-27034.

55. Kaser A., Zeissig S., Blumberg R.S. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28: 573-621.

56. Kelder T., Stroeve J.H., Bijlsma S. et al. Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. *Nutr. Diabetes.* 2014;4(6): e122.

57. Kendrick S.F., O'Boyle G., Mann J. et al. Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology.* 2010;51(6):. 1988-1997.

58. Keubler L.M., Buettner M., Häger C. et al. A multitarget model: colitis lessons from the interleukin-10-deficient mouse. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015;21(8): 1967–1975.

59. Kim M.H., Kang S.G., Park J.H. et al. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology.* 2013;145(2): 396-406.

60. Knoop K.A., McDonald K.G., Kulkarni D.H., Newberry R.D. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut.* 2016;65(7):1100-9. doi: 10.1136/gutjnl-2014-309059

61. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S. et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014;63(4): 578–587.

62. Kostic A.D., Xavier R.J., Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014;146(6): 1489-1499.

63. Kronman M.P., Zaoutis T.E., Haynes K. et al. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics*. 2012;130(4): 794–803.

64. Kühn R., Löhler J., Rennick D. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2): 263-274.

65. Larsson J.M., Karlsson H., Sjövall H., Hansson G.C. A complex, but uniform O-lycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology*. 2009;19(7): 756–766.

66. Le Poul E., Loison C., Struy S. [et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278(28): 25481–25489.

67. Lee S.U., In H.J., Kwon M.S. et al. b-Arrestin 2 mediates G protein-coupled receptor 43 signals tonuclear factor-kB. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(11): 1754-1759.

68. Lee W.J., Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol*. 2014;10(6): 416-424.

69. Leedham S.J., Brittan M., McDonald S.A. et al. Intestinal stem cells. *J. Cell Mol. Med*. 2005;9(1): 11-24.

70. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol*. 2007;7(9): 678–689.

71. Lin H.V., Frassetto A., Kowalik E.J. et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. 2012;7(4): e35240.

72. Liu H., Patel N.R., Walter L. et al. Constitutive expression of MMP9 in intestinal epithelium worsens murine acute colitis and is associated with increased levels of proinflammatory cytokine Kc. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2013;304(9): G793-803.

73. Luissint A.C., Parkos C.A., Nusrat A. et al. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair. *Gastroenterology*. 2016;151(4): 616-632.

74. MacFie J., O'Boyle C., Mitchell C. et al. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*. 1999;45(2): 223–228.

75. Magro F., Portela F. Management of inflammatory bowel disease with infliximab and other anti-tumor necrosis factor alpha therapies. *Bio. Drugs*. 2010;24(1): 3-14.

76. Marchesi, J.R., Holmes E., Khan F., et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res.* 2007;6(2): 546-551.

77. Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009;461(7268): 1282-1286.

78. Mathewson N.D., Jenq R., Mathew A.V. et al. Gut microbiome derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate Graft-versus-Host Disease. *Nat. Immunol.* 2016;17(5): 505-513.

79. McGuckin M.A., Eri R., Simms L.A. et al. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2009;15(1): 100-113.

80. McGuckin M.A., Lindén S.K., Sutton P., Florin T.H. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9(4): 265-278.

81. Milligan G., Stoddart L.A., Smith N.J. Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *Br J Pharmacol.* 2009;158(1): 146-153.

82. Nikkari S., McLaughlin I.J., Bi W. et al. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(5): 1956-1959.

83. Nilsson N.E., Kotarsky K., Owman C., Olde B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;303(4): 1047-1052.

84. Nøhr M.K., Egerod K.L., Christiansen S.H. Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience.* 2015;290: 126-137.

85. Nøhr M.K., Pedersen M.H., Gille A. et al. 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. *Endocrinology.* 2013;154(10): 3552-3564.

86. Okada Y., Sotozono M.-A., Sakai N., et al. Fucosylated Thomsen-Friedenreich antigen in a-anomeric configuration in human gastric surface epithelia: an allogenic carbohydrate antigen possibly controlled by the Se gene. *J. Histochem. Cytochem.* 1994;42: 371-376.

87. Okumura R., Takeda K. Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2016;92(9): 423-435.

88. Otsuka M., Kang Y.J., Ren J. et al. Distinct effects of p38alpha deletion in myeloid lineage and gut epithelia in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2010;138(4): 1255-1265.

89. Ott S.J, Musfeldt M., Wenderoth D.F. et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53: 685–693.

90. Pagel J.I., Deindl E. Disease progression mediated by Egr-1 associated signaling in response to oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci*. 2012;13(10): 13104-13117.

91. Paul G., Khare V., Gasche C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur. J. Clin. Invest*. 2012;42(1): 95-109.

92. Peng L., Li Z.R., Green R.S. et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2009;139(9): 1619-1625.

93. Potgieter M., Bester J., Kell D.B. et al. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol. Rev*. 2015;39(4): 567-591.

94. Priyadarshini M., Villa S.R., Fuller M. et al. An acetate-specific GPCR, FFAR2, regulates insulin secretion. *Mol Endocrinol*. 2015;29(7): 1055-1066.

95. Rapozo D.C., Bernardazzi C., de Souza H. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. *World J Gastroenterol*. 2017;23(12): 2124-2140.

96. Rashid M.U., Zaura E., Buijs M.J., Keijser B.J., Crielaard W., Nord C.E. et al. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods. *Clin Infect Dis*. 2015;60 Suppl 2:S77-84. doi: 10.1093/cid/civ137

97. Roediger W.E. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*. 1980;2: 712-715.

98. Roediger W.E., Duncan A., Kapaniris O. et al. Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes: a biochemical basis for ulcerative colitis? *Clin Sci (London)*. 1993;85(5): 623-627.

99. Roediger WE, Nance S. Selective reduction of fatty acid oxidation in colonocytes: correlation with ulcerative colitis. *Lipids*. 1990;25(10):646–652.

100. Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*. 1980;2(8197):712–71.

101. Ryu H., Lee J., Zaman K. et al. Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J Neurosci*. 2003;23(9): 3597-3606.

102. Sabatino A.D., Morera R., Ciccocioppo R. et al. Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22(9): 789-794.

103. Säemann M.D., Böhmig G.A., Osterreicher C.H. et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000;14(15): 2380-2382.

104. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134(2): 577-594.

105. Schilderink R., Verseijden C., de Jonge W.J. Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Front Immunol.* 2013;4: 226.

106. Scott N.A., Andrusaita A., Andersen P., Lawson M., Alcon-Giner C., Leclaire C. et al. Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis. *Sci Transl Med.* 2018;10(464). pii: eaao4755. doi: 10.1126/scitranslmed.aao4755

107. Shaw S.Y., Blanchard J.F., Bernstein C.N. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(12): 2133-2142.

108. Shirazi T., Longman R.J., Corfield A.P. et al. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad. Med.J.* 2000;76: 473-478.

109. Sina C., Gavrilova O., Förster M. et al. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol.* 2009;183(11): 7514-7522.

110. Sluis M.V., Koning B.A., Bruijn A.C. et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 2006;131(1): 117-129.

111. Smith P.M., Howitt M.R., Panikov N. et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013;341(6145): 569-573.

112. Srinivas S.R., Gopal E., Zhuang L. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J.* 2005;392: 655-664.

113. Stallmach A., Chan C.C., Ecker K.W. et al. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut.* 2000;47(3): 415-422.

114. Stoddart L.A., Smith N.J., Jenkins L. et al. 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. *J Biol Chem.* 2008;283(47): 32913-32924.

115. Sun J., Shen X., Li Y. et al. Therapeutic potential to modify the mucus barrier in inflammatory bowel disease. *Nutrients.* 2016;8(1): 44.

116. Tedelind S., Westberg F., Kjerrulf M., Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(20): 2826-2832.
117. Thangaraju M., Cresci G., Itagaki S. et al. Sodium-coupled transport of the short chain fatty acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 2008;12(10): 1773-1781.
118. Thibault R., Blachier F., Darcy-Vrillon B. Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010;16(4): 684-695.
119. Thornton J.R. High colonic pH promotes colorectal cancer. *Lancet.* 1981;8229(1): 1081-1083.
120. Tolhurst G., Heffron H., Lam Y.S. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes.* 2012;61(2): 364-371.
121. Tolstanova G, Deng X, French SW, Lungo W, Paunovic B, Khomenko T, et al. Early endothelial damage and increased colonic vascular permeability in the development of experimental ulcerative colitis in rats and mice. *Lab Invest.* 2012;92(1):9-21. doi: 10.1038/labinvest.2011.122
122. Topping D.L., Clifton P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 2001;81: 1031-1064
123. Tulstrup M.V., Christensen E.G., Carvalho V. et al. Antibiotic treatment affects intestinal permeability and gut microbial composition in Wistar rats dependent on antibiotic class. *PLoS One.* 2015;10(12): 1-17.
124. van Nuenen M.H., Venema K., van der Woude J.C., Kuipers E.J. The metabolic activity of fecal microbiota from healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2004;49(3): 485-491.
125. Vieira A.T., Macia L., Galvão I. et al. A role for gut microbiota and the metabolite-sensing receptor GPR43 in a murine model of gout. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(6): 1646-1656.
126. Vieira E.L., Leonel A.J., Sad A.P. et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem.* 2012;23(5): 430-436.
127. Viggiano D., Ianiro G., Vanella G. et al. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(6): 1077-1085.

128. Vinolo M.A., Hatanaka E., Lambertucci R.H. et al. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(1): 48-55.
129. Vinolo M.A., Rodrigues H.G., Nachbar R.T., Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients.* 2011; 3(10): 858–876.
130. Vogt S.L., Peña-Díaz J., Finlay B.B. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe.* 2015;34: 106-115.
131. von Lampe B., Barthel B., Coupland S.E. et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2000;47(1): 63–73.
132. Wlodarska M., Willing B., Keeney K.M., Menendez A., Bergstrom K.S., Gill N. et al. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect Immun.* 2011;79(4):1536-45. doi: 10.1128/IAI.01104-10
133. Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40: 235–243.
134. Wu H.J., Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes.* 2012;3(1): 4–14.
135. Yin L., Laevsky G., Giardina C. Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity. *J Biol Chem.* 2001;276(48): 44641-44646

РОЗДІЛ 3

ОБҐРУНТУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА СИМБІТЕР ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ ВІДДАЛЕНИМ НАСЛІДКАМ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ

*Т. М. Сергійчук, Л. В. Закордонець, С. О. Крамарев,
Д. С. Янковський, Г. М. Толстанова*

Мікроекологічні порушення та можливість їх корекції набуває все більшої актуальності з огляду на розширення знань щодо значення нормобіоти для гомеостазу організму людини. Доведеними є факти дисбіотичних змін складу та функцій нормобіоти за різноманітних соматичних захворювань, метаболічного синдрому, аутоімунних захворювань, запальних захворювань шлунково-кишкового тракту, алергії, розвитку окремих типів ракових пухлин, нейродегенеративних розладів та багатьох інших гострих і хронічних патологічних станів [Волкова Н. И., 2019; Caminer A. C., 2017; Турчина М. С., 2019; Шендеров Б., 2016; Bercik P., 2012; Багиров Н. С., 2018].

Патологічно змінена мікробна екосистема може бути пусковим механізмом розвитку захворювання, сприяти його хронізації з розвитком і прогресуванням метаболічних та імунних розладів, формуванням в організмі резервуарів ендогенної інфекції різноманітної етіології та локалізації. Тому діагностика та корекція порушень нормобіоти набула глобального характеру і є прерогативою для спеціалістів різних галузей медицини. Зростаюча у зв'язку з цим потреба медицини в антидисбіозній терапії призвела до лавиноподібного збільшення асортименту цих препаратів. Втім, не багато з цих біоценозовідновлюючих препаратів (пробіотиків, пребіотиків, нутріцевтиків, метабіотиків тощо) мають достатню ефективність, навіть

з'являється все більша кількість повідомлень про негативні наслідки їх використання [Salminen M. K. et al., 2004; Kunz A. N., 2004; Oudhuis G. J., 2011; Suez J. et al., 2018; Yelin I. et al., 2019].

Найвизнанішими біокоректорами біоценозів до теперішнього часу, безперечно, залишаються пробіотики. На особливу увагу заслуговують мультипробіотики. Це бактеріотерапевтичні препарати нового покоління, сворені в Україні. Основними відмінностями мультипробіотиків групи Симбітер є наближення їх складу і властивостей до фізіологічного комплексу анаеробно-цукролітичних бактерій облігатної мікробіоти [Ширококов В. П., 2010; Янковский Д. С., 2005].

3.1. Експериментальне обґрунтування ефективності різних режимів введення мультипробіотика Симбітер для запобігання віддаленим наслідкам впливу антибіотика широкого спектра дії цефтріаксону на гомеостаз кишечника

Ми всебічно проаналізували три режими введення мультипробіотика Симбітер® ацидофільний концентрований (ТОВ фірма «О.Д. Пролісок», Україна) на фоні цефтріаксон-модельованого дисбіозу (рис 3.1):

1-й режим – одночасне введення антибіотика та пробіотика;

2-й режим – пробіотик вводили після відміни введення антибіотика;

3-й режим – пробіотик вводили одночасно з введенням антибіотика і продовжили вводити ще визначений час після відміни антибіотика.

Мультипробіотик Симбітер® ацидофільний концентрований містить біомасу живих клітин у вигляді «живої» (неліофілізованої) форми з симбіотичною асоціацією 14–24 штамів найбільш фізіологічних для людини бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9 у флаконі.

Szajewska H., 2011]. Свої спостереження за змінами стану мікробіоти та епітелію слизової кишки ми проводили в динаміці – через два та вісім тижнів після закінчення схеми введення препаратів. Цефтріаксон вводили в дозі 300 мг/кг, Симбітер ацидофільний – у дозі 160 мг/кг (сумарне мікробне число $1,6 \cdot 10^9$ КУО/кг).

РЕЖИМ І. Одночасне введення антибіотика та пробіотика (Цф+Сим). Тваринам 1 раз на добу впродовж 14 діб внутрішньом'язово вводили антибіотик цефтріаксон, а через 4 год – перорально мультипробіотик Симбітер ацидофільний концентрований (рис. 3.1).

При дослідженні мікробіоти пристінкової біоптата тонкої кишки було продемонстровано, що схема одночасного застосування цефтріаксону з Симбітером не дозволяє повністю усунути дисбіотичні прояви. На восьмий тиждень після відміни введення обох препаратів залишалися зниженими показники представників роду *Lactobacillus*, а кількість представників роду *Bacteroides* нормалізувалась лише до восьмого тижня (табл. 3.1).

Таблиця 3.1. Зміни пристінкової мікробіоти ($M \pm m$ ІгКУО/см²) тонкої кишки щурів через два та вісім тижнів після 14-добового одночасного введення цефтріаксону та Симбітеру

Мікробіота	Термін	Дослідні групи			
		інтактний контроль	контроль Симбітеру	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим
<i>Bifidobacterium</i>	2 тиж.	6,8±0,7	6,7±0,9	7,5±0,2	6,1±0,1
	8 тиж.	6,4±0,3	6,8±1,2	4,8±0,2*	6,1±0,9^
<i>Lactobacillus</i>	2 тиж.	4,9±0,4	4,5±0,3	4,9±0,3	4,2±0,2
	8 тиж.	4,7±0,1	4,9±0,3	2,9±0,7*	3,4±0,5*
<i>Bacteroides</i>	2 тиж.	1,5±0,3	1,2±0,4	6,0±0,3*	4,2±0,2*^
	8 тиж.	1,0±0,1	1,9±0,5	4,2±0,8*	1,7±0,1^

Продовження табл. 3.1

Мікробіота	Термін	Дослідні групи			
		інтактний контроль	контроль Симбітеру	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	2 тиж.	0"	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"	0"
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	2 тиж.	0"	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"	0"
Умовно-патогенні ентеробактерії	2 тиж.	0"	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"	0"
<i>Staphylococcus spp.</i>	2 тиж.	0"	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"	0"
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 тиж.	0"	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"	0"
<i>Clostridium spp.</i>	2 тиж.	0,4±0,3	0"	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,3	0"	3,0±0,3	0"

Примітка. 0" – рівень виділення мікроорганізму < 10; * – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у контрольній групі); ^ – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон).

Аналізуючи ефективність впливу схеми одночасного введення цефтріаксону з мультипробіотиком Симбітер на **мікробіологічний стан пристінкового біоптата товстої кишки** через 2 тижні після відміни їх введення відмічали, що таке поєднання має помірно виражений позитивний ефект (табл. 3.2). Відмічається зникнення кишкової палички зі зміненими ферментативними властивостями, наявність якої є достовірним

показником початку розвитку дисбактеріозу. Але при цьому не виділялась також і *E. coli* з нормальними ферментативними властивостями, яка відіграє важливу роль у роботі шлунково-кишкового тракту. Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю є безпосереднім конкурентом умовно-патогенної мікрофлори – разом з біфідо- і лактобактеріями вона перешкоджає її розмноженню [Янковский Д. С., 2017]. Також виявлена дещо більша за контроль кількість бактерій роду *Staphylococcus*.

Таблиця 3.2. Зміни пристінкової мікробіоти ($M \pm m$ ІгКУО/см²) товстої кишки щурів через два та вісім тижнів після 14-добового одночасного введення цефтріаксону та Симбітеру

Мікробіота	Термін	Дослідна група			
		інтактний контроль	контроль Симбітеру	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим
<i>Bifidobacterium</i>	2 тиж.	6,4±0,2	6,5±0,2	4,1±0,2*	4,9±0,1*
	8 тиж.	6,4±0,8	6,2±0,2	4,8±0,2*	3,4±0,1*
<i>Lactobacillus</i>	2 тиж.	4,9±0,1	4,5±0,3	4,0±0,3	3,6±0,2
	8 тиж.	4,9±0,1	4,9±0,3	2,9±0,2*	6,1±0,5^
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 тиж.	2,3±0,1	2,0±0,5	3,1±0,3	3,0±0,2
	8 тиж.	2,3±0,1	1,0±0,5	0,6±0,8	1,7±0,1
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	2 тиж.	2,0±0,1	3,5±0,2	0"	0"
	8 тиж.	2,2±0,1	3,3±0,1	0"	0"
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	2 тиж.	1,6±0,2	0*	0"	1,4±0,1
	8 тиж.	1,6±0,2	1,2±0,2	0"	0,9±0,1

Мікробіота	Термін	Дослідна група			
		інтактний контроль	контроль Симбітеру	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим
Умовно-патогенні ентеробактерії	2 тиж.	0"	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	5,0±0,1*	0"∧
<i>Staphylococcus spp.</i>	2 тиж.	0,5±0,2	0,8±0,2	1,5±0,8*	2,0±0,3
	8 тиж.	0,5±0,2	0,2±0,2	3,1±0,1*	1,6±0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 тиж.	0,4±0,1	0,8±0,2	0"	1,7±0,3
	8 тиж.	0,4±0,1	0,6±0,2	2,1±0,1	2,3±0,1
<i>Clostridium spp.</i>	2 тиж.	0,4±0,3	0"	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,3	0"	3,0±0,3*	0"

Примітка. 0" рівень виділення мікроорганізму < 10; * – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у контрольній групі); ∧ – P<0,05 (порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон).

Від структурного та функціонального стану тонкої кишки залежить всмоктування всіх поживних речовин. Її термінальний відділ відіграє ключову роль у забезпеченні рециркуляції жовчних кислот і, відповідно, всмоктування жирів. Епітеліальний бар'єр тонкої кишки, на відміну від товстої, має вищий ступінь фізіологічної проникності і більш вразливий до будь-яких гомеостатичних зрушень, зокрема, змін у складі нормобіоти [Kuhn K. A., 2013].

Ми оцінили самостійне введення пробіотика Симбітер ацидофільний на стан епітелію слизової шлунково-кишкового тракту, оскільки відомостей щодо впливу цього пробіотика на кишкову мікробіоту досить багато, а от даних щодо впливу на структурну та функціональну характеристики епітеліальних клітин немає.

У щурів, які отримували протягом 14 діб пробіотик Симбітер **гістологічна структура стінки тонкої кишки** при візуальному мікроскопічному огляді не має суттєвих відхилень від

норми. Товщина слизової оболонки зростає на 7,6 % ($P < 0,05$), проте висота ворсинок та глибина крипт у слизовій оболонці не зазнають достовірних змін, порівняно з контрольною групою тварин. У ворсинках зростають висота війчастих епітеліоцитів та площа поперечного перерізу їхніх ядер – на 9,4 % та 10,2 % ($P < 0,05$) відповідно, що може свідчити про активацію цих клітин. У криптах висота війчастих епітеліоцитів не змінюється, але площа поперечного перерізу їхніх ядер зменшується, порівняно з контрольною групою. Площа поперечного перерізу слизових келихоподібних клітин дещо зростає, як у ворсинках, так і у криптах. Введення мультипробіотика самого не мало впливу на стан опасистих клітин.

Отже, гістологічна структура слизової оболонки стінки тонкої кишки піддослідних щурів, які впродовж 14 діб отримували мультипробіотик Симбітер, у першу добу відміни його введення суттєво не відрізняється від показників контрольної групи щурів (табл. 3.3).

Через 2 тижні після відміни введення Симбітеру в стінці тонкої кишки значно зменшується товщина слизової оболонки, порівняно з контрольною групою. Висота ворсинок зменшується значною мірою, але глибина крипт зростає. При візуальному мікроскопічному огляді відмічається зменшення товщини слизової оболонки, ворсинки здаються вкороченими. У ворсинках зростає висота війчастих епітеліоцитів та площа поперечного перерізу їхніх ядер. У криптах висота війчастих епітеліоцитів та площа поперечного перерізу їхніх ядер також є достовірно вищою, порівняно з контрольною групою. Це, ймовірно, свідчить про набряк війчастих епітеліоцитів. Площа поперечного перерізу слизових келихоподібних клітин, які знаходяться у ворсинках і криптах, значно зростає, тобто існує тенденція до гіпертрофії цих клітин. Вміст цих клітин інтенсивно забарвлений.

Отже, через два тижні після відміни введення мультипробіотика Симбітер у слизовій оболонці щурів спостерігається тенденція до атрофічних процесів (у тому числі за рахунок зменшення висоти ворсин); основні морфометричні параме-

три війчастих епітеліоцитів і келихоподібних клітин зростають, що може бути свідченням набряку.

Таблиця 3.3. Морфометричні параметри слизової оболонки тонкої кишки щурів після одночасного введення антибіотика цефтріаксону та пробіотика Симбітер

Ділянка слизової	Термін	Дослідна група			
		інтактний контроль	контроль Симбітеру	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим
Товщина слизової оболонки, мкм	2 тиж.	541±7	405±7*	423±6*	336±4*^
	8 тиж.		419±6*	471±3*	416±4*^
Висота ворсинок, мкм	2 тиж.	231±4	176±3*	148±4*	166±2*^
	8 тиж.		153±2*	175±3*	140±3*^
Глибина крипт, мкм	2 тиж.	173±5	184±3	168±3	129±2*^
	8 тиж.		169±3	140±4*	159±3*^
Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок, мкм	2 тиж.	19,5±0,5	22,1±0,7*	20,8±0,6	23,8±0,6*^
	8 тиж.		22,3±0,5*	21,4±0,3*	28,2±0,8*^
Висота війчастих епітеліоцитів крипт, мкм	2 тиж.	20,0±0,3	22,9±0,4*	22,8±0,5*	24,6±0,4*^
	8 тиж.		20,9±0,4	18,5±0,3*	24,9±0,5*^

Примітка. * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

Через вісім тижнів після введення пробіотика з антибіотиком у піддослідних щурів подальшого зменшення товщини слизової оболонки, висоти ворсинок і глибини крипт не спостерігається. Товщина слизової оболонки залишається меншою,

порівняно з контрольною групою. Певні зміни відбуваються з в'їчастими епітеліоцитами та слизовими келихоподібними клітинами. В'їчасті епітеліоцити, які знаходяться в ворсинках, залишаються гіпертрофованими, оскільки висота цих клітин та площа поперечного перерізу їхніх ядер достовірно більші, порівняно з контрольною групою (табл. 3.3). Площі поперечного перерізу келихоподібних клітин крипт і ядер ворсинок значно зменшуються, тому можна говорити про послаблення гіпертрофії цих клітин, аж до її повного зникнення (табл. 3.3). Інтенсивність забарвлення цих клітин середня.

Отже, у слизовій оболонці стінки тонкої кишки щурів зберігається тенденція до атрофії, проте зменшується площа перерізу в'їчастих епітеліоцитів крипт і нормалізується стан келихоподібних клітин. Однак на другий тиждень досліджень спостерігається зниження кількості гранул в опасистих клітинах, а через 8 тижнів цей показник повертається до норми.

Цікаво, що збільшення висоти ентероцитів та площі поверхні їх ядер відбувається у відповідь на дію як антибіотика, так і мультипробіотика, при цьому першими реагують клітини на поверхні ворсин, і лише згодом, на 29 добу після відміни застосування, подібно збільшується висота ентероцитів у криптах. Що логічно, адже першим місцем контакту пробіотичних мікроорганізмів та антибіотика є ворсини, які знаходяться на поверхні, а в міру свого розповсюдження дія мультипробіотика та антибіотика охоплює більш глибокі структури, крипти [Bleich M., 1997].

Таким чином, самостійне введення пробіотика Симбітер не є нейтральним для тонкого кишечника, а викликає різноспрямовані ефекти у слизовій оболонці стінки тонкої кишки, в'їчастих епітеліоцитах та келихоподібних слизових клітинах. Зокрема, після 14 діб введення щурам пробіотика гістологічна картина стінки слизової оболонки достовірно не відрізняється від контрольної групи і є нормальною. Через два тижні після відміни препаратів спостерігається зменшення товщини слизової оболонки, тоді як площа перерізу в'їчастих епітеліоцитів і келихоподібних клітин зростає. Через вісім тижнів, тобто

в більш віддалений період, суттєво зменшуються площі перерізу слизових келихоподібних клітин крипт і ворсинок та війчастих епітеліоцитів крипт, хоча товщина слизової оболонки не змінюється.

При дослідженні впливу одночасного введення цефтріаксону з Симбітером на гістологічні параметри тонкої кишки виявлено такі тенденції: істотне зменшення товщини слизової оболонки, порівняно з контрольною групою тварин; висота ворсинок та глибина крипт достовірно менші, ніж аналогічні морфометричні параметри у контрольній групі. Зменшення величини цих параметрів вказує на виникнення атрофічних процесів у слизовій оболонці стінки тонкої кишки щурів. Усі шари присутні. Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок та площа поперечного перерізу їхніх ядер дещо зростає, порівняно з контрольною групою. Висота війчастих епітеліоцитів крипт зменшується, тоді як площа поперечного перерізу їх ядер зростає (табл. 3.3).

Через 2 тижні експерименту застосування I схеми антибіотика з мультипробіотиком у стінці тонкої кишки піддослідних щурів спостерігається посилення атрофічних процесів, які виявляються сильнішими, порівняно з групою, якій вводили лише цефтріаксон. Це підтверджується значним зменшенням товщини слизової оболонки, розміри якої стають достовірно меншими, порівняно з контрольною групою та групою, якій вводили цефтріаксон. Висота ворсинок займає проміжне положення між контрольною групою та групою, яка отримувала цефтріаксон. Глибина крипт є достовірно меншою, порівняно з групою, яка отримувала тільки цефтріаксон, та контрольною групою (див. табл. 3.3). Стінка тонкого кишечника є стоншеною. Також спостерігається гіпертрофія війчастих епітеліоцитів ворсинок, що підтверджується зростанням основних морфометричних параметрів цих клітин. Висота війчастих епітеліоцитів крипт зростає, а площа поперечного перерізу ядер цих клітин займає проміжне положення, порівняно з групою, якій вводили лише цефтріаксон, і контрольною групою тварин. Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин

крипт і ворсинок є достовірно більшою, порівняно з контрольною групою, і набагато меншою, порівняно з групою, яка отримувала лише цефтріаксон.

При цьому відбувається зниження інтенсивності забарвлення опасистих клітин, забарвлених толуїдиновим синім та, відповідно, зменшується кількість гранул у них (рис. 3.2).

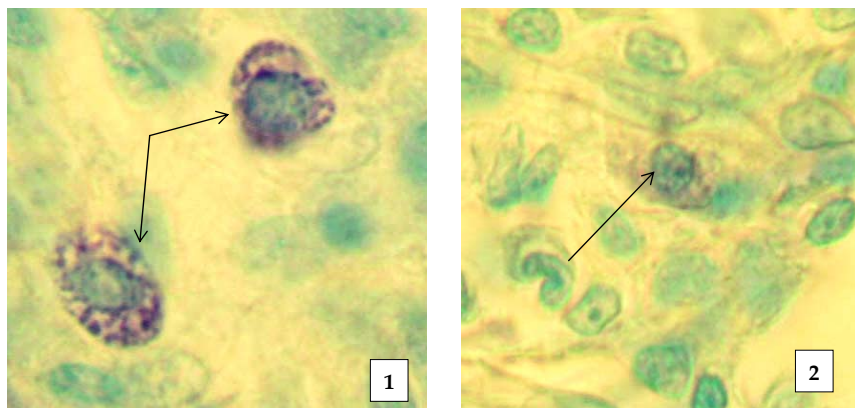


Рис. 3.2. Стан опасистих клітин слизової оболонки тонкої кишки та кількість гранул в опасистих клітинах у контролі (1) та після одночасного застосування антибіотика цефтріаксону з мультипробіотиком, через 2 тижні після їх відміни (2). Забарвлення толуїдиновим синім. Збільшення $\times 900$.

Отже, через 2 тижні після відміни препаратів посилюються атрофічні процеси в слизовій оболонці, а також посилюється гіпертрофія війчастих епітеліоцитів та келихоподібних клітин та відбувається дегрануляція опасистих клітин у слизовій оболонці тонкої кишки.

Через 8 тижнів після відміни мультипробіотика Симбітер та антибіотика цефтріаксон у тварин при візуальному мікроскопічному огляді не спостерігається суттєвих відхилень гістологічної будови стінки тонкої кишки. Всі шари наявні, хоча деяка кількість ворсинок зазнала атрофії. Висота ворсинок менша, порівняно з контрольною групою і групою, яка отримувала тільки цефтріаксон. Глибина крипт значно біль-

ша, порівняно з групою, яка отримувала лише антибіотик, і достовірно не відрізняється від контрольної групи. Товщина слизової оболонки становить (416 ± 4) мкм, тоді як у контрольній групі цей параметр становить (541 ± 7) мкм, а в групі, яка отримувала лише цефтріаксон – (471 ± 3) мкм (див табл. 3.3). Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок і крипт та площа поперечного перерізу їхніх ядер є достовірно вищими, порівняно з контрольною групою тварин, і групою, яка отримувала лише цефтріаксон. Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин крипт і ворсинок також є достовірно більшою, порівняно з цими групами.

Водночас продовжуються дегрануляція опасистих клітин та зниження кількості гранул у них, тобто прозапальні процеси мають місце навіть у такі віддалені терміни після введення антибіотика і їх не компенсує застосування пробіотика (рис. 3.3, 3.4).

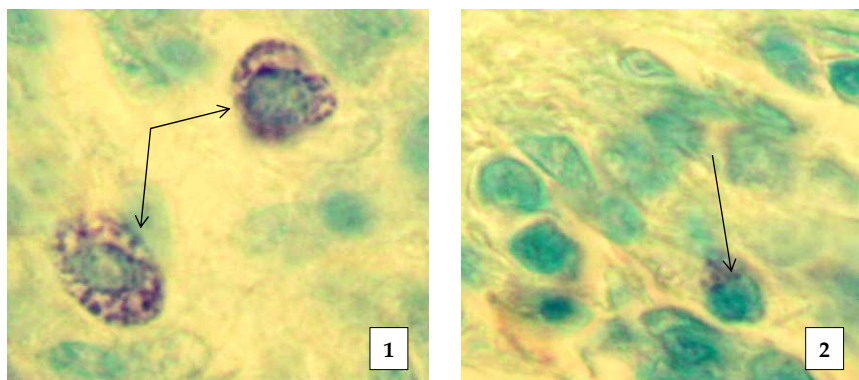


Рис. 3.3. Стан опасистих клітин слизової оболонки тонкої кишки та кількість гранул в опасистих клітинах у контролі (1) та після одночасного застосування цефтріаксону з мультипробіотиком, через 8 тижнів після їх відміни (2). Забарвлення толуїдиновим синім. Збільшення $\times 900$

Можна стверджувати, що у віддаленій перспективі гіпертрофія війчастих епітеліоцитів та келихоподібних клітин продовжує нестримно зростати, що, найімовірніше, свідчить про

набряк цих клітин, а зниження кількості гранул в опасистих клітинах свідчить про прозапальні зміни у слизовій оболонці.

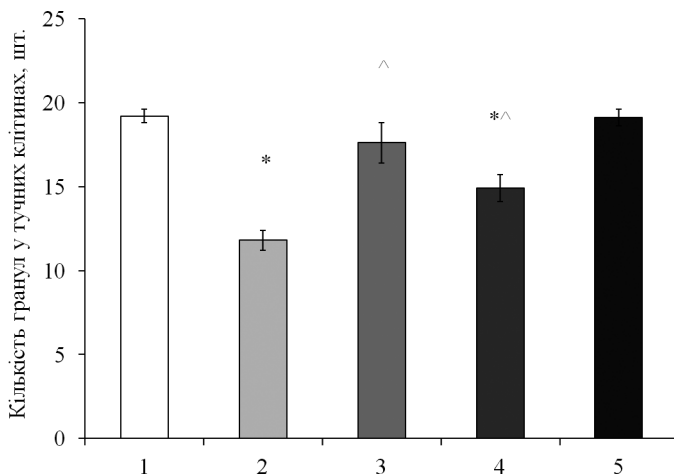


Рис. 3.4. Кількість гранул в опасистих клітинах слизової оболонки тонкої кишки після застосування антибіотика цефтріаксон (300 мг/кг внутрішньом'язово) з мультипробіотиком, протягом 14 діб, 15 доба експерименту. 1 – контроль; 2 – цефтріаксон 14 діб, аутопсія на 15 день; 3 – цефтріаксон+мультипробіотик 14 діб, аутопсія на 15 день; 4 – цефтріаксон+мультипробіотик 14 діб, аутопсія через 2 тижні після відміни; 5 – цефтріаксон+мультипробіотик 14 діб, аутопсія через 8 тижнів після відміни.

Келихоподібні клітини – тип спеціалізованих епітеліоцитів, які відіграють захисну роль у кишечнику завдяки продукції біоактивних компонентів, що включають муцини, кишкові фактори (trefoil factors) та інші протимікробні субстанції [Hajela N., 2012], що сприяє цілісності кишкового бар'єра та забезпечує гомеостаз здорової кишки [Aihara E., 2017]. Дослідженнями останніх років було показано, що окрім захисної функції, келихоподібні клітини епітелію тонкої кишки можуть виконувати транспортну, утворюючи goblet cells associated-antigen passages (GCPs канали) для проникнення водорозчинних низькомолекулярних речовин із просвіту кишки

до дендритних клітин у *lamina propria* [Makkink M., 2002]. Крім того, антибіотики можуть викликати розвиток запалення, стимулюючи утворення GCPs у келихоподібних клітинах та викликаючи транслокацію бактерій-коменсалів у лімфатичні вузли слизової оболонки тонкої кишки [McDole J. R., 2012]. Можливо, саме утворення GCPs каналів є шляхом виникнення запалення, викликаного застосуванням антибіотика.

Отже, серед ефектів, які викликає використання першого режиму введення пробіотика Симбітер і антибіотика цефтріаксон у стінці тонкої кишки щурів, є сильна атрофія слизової оболонки (хоча вона дещо послаблюється з часом) і набряк війчастих епітеліоцитів та келихоподібних клітин.

З вищенаведеного можна зробити висновок, що введення пробіотика Симбітер і антибіотика цефтріаксон протягом 14 діб і одночасна відміна обох препаратів не забезпечує усунення негативних наслідків впливу антибіотика. В цій групі має місце виникнення атрофії слизової оболонки та атрофії келихоподібних клітин, що супроводжується зменшенням їхньої функціональної активності, яка полягає у синтезі і екскреції слизу. У груп тварин, яким здійснили аутопсію через 2 тижні, було виявлено посилення атрофії слизової оболонки та гіпертрофію келихоподібних клітин і війчастих епітеліоцитів. У дальшій перспективі, через 8 тижнів, атрофія слизової оболонки дещо послаблюється, гіпертрофія війчастих епітеліоцитів та келихоподібних клітин залишається.

При дослідженні впливу одночасного введення цефтріаксону та Симбітеру на **морфометричні показники товстої** кишки щурів насамперед перевіряли вплив введення лише Симбітеру. Показали, що у тварин, які отримували пробіотик Симбітер протягом 14 діб стінка товстої кишки має нормальну гістологічну будову, але через вісім тижнів після відміни введення Симбітеру товщина слизової незначно зменшується (табл. 3.4).

Гістологічні зміни в стінці товстої кишки, що є наслідком 14-добового введення Симбітеру нагадують такі після 14-добового введення антибіотика, особливо, віддалені наслідки їх застосування. Однею з гіпотез виникнення таких віддалених

змін у морфофункціональному стані стінки товстої кишки ми вважали зміни мікробіотного складу [Путников А. В., 012]. Хоча, при введенні Симбітеру здоровим тваринам достовірних змін у складі нормобіоти товстої кишки не спостерігали [Dovbinchuk T., 2012], показники даної групи не використовували для порівняльного аналізу. Тому вказаний синергізм змін структурного та функціонального стану кишечника потребує іншого обґрунтування.

При візуальному мікроскопічному огляді виявлено, що гістологічна картина стінки товстої кишки зазнає певних змін. Усі шари присутні. В стінці товстої кишки є тенденція до атрофії, що підтверджується зменшенням товщини слизової оболонки порівняно з контрольною групою.

Має місце зменшення глибини крипт, порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон. Висота війчастих епітеліоцитів крипт займає проміжне положення між контрольною групою і групою, якій вводили цефтріаксон. Площа поперечного перерізу ядер цих клітин зменшується.

У келихоподібних клітинах виникає тенденція до атрофії, оскільки площа поперечного перерізу цих клітин менша, ніж у контрольній групі, й становить $(58,2 \pm 2,6)$ мкм² (табл. 3.4). Слизові келихоподібні клітини менш інтенсивно забарвлені альціановим синім, що свідчить про розрідження і зниження концентрації в них слизу.

Кількість гранул в опасистих клітинах у стінці товстої кишки у тварин цієї групи залишалась на рівні контрольних значень.

Через два тижні після відміни пробіотика Симбітер і антибіотика цефтріаксон спостерігаються наступні зміни в стінці товстої кишки піддослідних щурів: товщина слизової оболонки майже не змінюється і є достовірно нижчою, порівняно з контрольною групою; глибина крипт ще більше зменшується, порівняно з контролем. Візуальний мікроскопічний огляд також підтверджує тенденції до атрофічних процесів у стінці товстої кишки. Висота війчастих епітеліоцитів і площа поперечного перерізу їхніх ядер достовірно не відрізняються від аналогічних показників у щурів контрольної групи (табл. 3.4).

Таблиця 3.4. Морфометричні параметри слизової оболонки товстої кишки щурів після одночасного введення антибіотика цефтріаксон та пробіотика Симбітер

Ділянка слизової	Термін	Дослідна група			
		інтактний контроль	контроль Симбітеру	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим
Товщина слизової оболонки, мкм	2 тиж.	321±4	333±5	318±6*	298±4*^
	8 тиж.		291±8*	251±3*	223±4*
Глибина крипт, мкм	2 тиж.	223±5	206±7*	202±3*	200±2*
	8 тиж.		219±5	194±4*	209±3*
Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок, мкм	2 тиж.	17,5±0,3	20,5±0,3	15,8±0,6	16,8±0,6*^
	8 тиж.		15,5±0,2*	11,4±0,3*	18,2±0,8*^
Площа перерізу келихоподібних клітин, мкм	2 тиж.	65,6±3,3	57,5±2,2*	52,0±0,5*	53,8±0,4*
	8 тиж.		73,0±3,0*	59,4±0,3*	61,3±0,5*

Примітка.* – $P < 0,05$ порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – $P < 0,05$ порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

Атрофія келихоподібних клітин послаблюється, оскільки зростає площа їх поперечного перерізу.

У віддаленій перспективі, через вісім тижнів після припинення введення пробіотика Симбітер і антибіотика цефтріаксон у стінці товстої кишки піддослідних щурів триває подальше зменшення товщини слизової оболонки. Глибина крипт також зменшується (див. табл. 3.4). При візуальному мікроскопічному огляді видно атрофію слизової оболонки. Висота війчастих епітеліоцитів вища, порівняно з контрольною групою. Площа поперечного перерізу ядер війчастих епі-

теліоцитів значно нижча, порівняно з групою, яка отримувала цефтріаксон, і контрольною групою. Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин також продовжує зростати, отже, атрофія продовжує послаблюватись. Тобто через 8 тижнів після відміни препаратів атрофія слизової оболонки зберігається на досить високому рівні, а атрофія келихоподібних клітин зменшується.

Однак, кількість гранул в опасистих клітинах була на 23,4 % нижчою, ніж у контролі, та на 49,7 % ($P < 0,05$) нижчою за показник у групі, тваринам якої вводили лише цефтріаксон. Отже, І схема введення пробіотика Симбітер разом з антибіотиком цефтріаксон протягом 14 діб і одночасна відміна обох препаратів є малоефективною для усунення негативних наслідків від введення антибіотика [Putnikov A., 2013; Довбинчук Т. В., 2013; Beregova T. et al., 2013].

РЕЖИМ ІІ. Введення пробіотика після відміни введення антибіотика (Цф→Сим). Щурам 1 раз на день протягом 14 діб внутрішньом'язово вводили антибіотик цефтріаксон, а з 15 до 28 доби вводили мультипробіотик Симбітер ацидофільний концентрований (рис 3.1).

При мікробіологічному дослідженні біоптата тонкої кишки виявили, що всі кількісні показники досліджуваних представників бактерій при веденні Симбітеру після введення цефтріаксону нормалізувались до значень контрольної групи (табл. 3.5).

Таблиця 3.5. Зміни пристінкової мікробіоти ($M \pm m$ ІgKYO/ cm^2) тонкої кишки щурів через два та вісім тижнів після введення цефтріаксону, а за ним Симбітеру

Мікробіота	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф→Сим
<i>Bifidobacterium</i>	2 тиж.	6,8±0,7	7,5±0,2	6,9±0,8
	8 тиж.	6,4±0,3	4,8±0,2*	6,3±0,8^

Продовження табл. 3.5

Мікробіота	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф→Сим
<i>Lactobacillus</i>	2 тиж.	4,9±0,4	4,9±0,3	5,1±0,4
	8 тиж.	4,7±0,1	2,9±0,7*	5,0±0,1^
<i>Bacteroides</i>	2 тиж.	1,5±0,3	6,0±0,3*	3,1±0,9^
	8 тиж.	1,0±0,1	4,2±0,8*	0,9±0,2^
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
Умовно-патогенні ентеробактерії	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Staphylococcus spp.</i>	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Clostridium spp.</i>	2 тиж.	0,4±0,3	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,3	3,0±0,3	0"^^

Примітка. 0" рівень виділення мікроорганізму <10; * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

Ця схема введення виявилась ефективною і для показників пристінкового біоптата товстої кишки щурів. Відмі-

чаються нормалізація кількості анаеробних цукролітичних бактерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* (табл. 3.6) та зменшення грамнегативних цукролітичних представників роду *Bacteroides*. Представники роду *Bacteroides* залучені в процеси зброджування вуглеводів, утилізації білків і біотрансформації жовчних кислот, а також є антагоністами шигел та сальмонел. Проте збільшена кількість цих бактерій, особливо *Bacteroides fragilis*, має патогенний характер – *Bacteroides fragilis* асоційована з запальною діареєю, вона виробляє ентеротоксин, який стимулює дегенерацію епітеліоцитів кишечника людини через вплив Е-кадгерину. Також побічні продукти метаболізму представників роду *Bacteroides* інгібують функцію поліморфноядерних лейкоцитів людини, які відіграють дуже важливу роль у захисті організму від інфекцій [Guarner F., 2003; Lyras D. et al., 2009; Carter G. P., 2010].

Таблиця 3.6. Зміни пристінкової мікробіоти (M+m IgKУО/см²) товстої кишки щурів через два та вісім тижнів після введення цефтріаксону, а за ним Симбітеру

Мікробіота	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф→Сим
<i>Bifidobacterium</i>	2 тиж.	6,4±0,2	4,1±0,2*	6,3±0,7
	8 тиж.	6,4±0,8	4,8±0,2*	6,0±0,2
<i>Lactobacillus</i>	2 тиж.	4,9±0,1	4,0±0,3	4,4± 0,9
	8 тиж.	4,9±0,1	2,9±0,2*	3,9±0,2
<i>Bacteroides</i>	2 тиж.	2,3±0,1	3,1±0,3	0,9±0,5
	8 тиж.	2,3±0,1	0,6±0,8	1,8±0,5
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	2 тиж.	2,0±0,1	0"	0"
	8 тиж.	2,2±0,1	0"	2,9±0,1

Продовження табл. 3.6

Мікробіота	Тер-мін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф→Сим
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	2 тиж.	1,6±0,2	0"	0"
	8 тиж.	1,6±0,2	0"	0,7±0,5
Умовно-патогенні ентеробактерії	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	5,0±0,1*	0"
<i>Staphylococcus spp.</i>	2 тиж.	0,5±0,2	1,5±0,8*	0"
	8 тиж.	0,5±0,2	3,1±0,1*	0"
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 тиж.	0,4±0,1	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,1	2,1±0,1	0"
<i>Clostridium spp.</i>	2 тиж.	0,4±0,3	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,3	3,0±0,3*	0"

Примітка. 0" рівень виділення мікроорганізму <10; * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

Привертає увагу, що використання Симбітеру після введення цефтріаксону приводить до елімінації з кишкової біоплівки умовно-патогенних ентеробактерій, стафілококів та кластридій.

Гістологічні дослідження показали, що у груп тварин, яких виводили з експерименту через два тижні після завершення введення препаратів, при візуальному мікроскопічному огляді **структура стінки тонкої кишки** є типовою, а атрофічні процеси не виражені. Присутні всі шари. Товщина слизової оболонки достовірно не відрізняється від контрольної групи і, відповідно, набагато більша, ніж у групи, якій вводили тільки цефтріаксон. Проте висота ворсинок має проміж-

ний між контрольною групою і групою, якій вводили лише цефтріаксон, показник (рис. 3.5). Основні морфометричні параметри війчастих епітеліоцитів, розташованих у ворсинках і криптах, зростають, та стають достовірно вищими, порівняно з контрольною групою і групою, яка отримувала цефтріаксон. Можливо, це свідчить про активацію цих клітин [Кноор К. А., 2016].

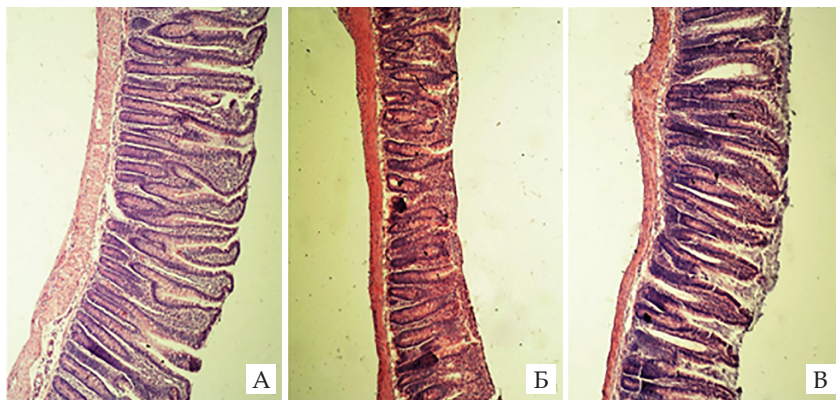


Рис. 3.5. Стан стінки тонкої кишки через два тижні після введення цефтріаксону, а за ним Симбітеру. Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином. Збільшення: об. $\times 10$, ок. $\times 10$. А – контроль, Б – цефтріаксон, В –Цф→Сим.

Слизові келихоподібні клітини у криптах менш гіпертрофовані, порівняно з тваринами, що отримували цефтріаксон без Симбітеру, а у ворсинках площа поперечного перерізу цих клітин взагалі не зазнає достовірних змін, порівняно з контрольними значеннями. Крім того, спостерігається покращення секреції слизовими клітинами, що відображається в наявності на поверхні ворсинок товстого шару слизу.

При застосуванні II схеми пробіотика було відмічено зменшення кількості гранул в опасистих клітинах стінки тонкої кишки на 27,6 %, порівняно з контролем ($P < 0,05$) (табл. 3.7).

Таблиця 3.7. Морфометричні параметри слизової оболонки тонкої кишки після введення цефтріаксону, а за ним Симбітеру

Ділянка слизової	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф→Сим
Товщина слизової оболонки, мкм	2 тиж.	541±7	423±6*	559±6*
	8 тиж.		471±3*	544±3^
Висота ворсинок, мкм	2 тиж.	231±4	148±4*	200±4*^
	8 тиж.		175±3*	215±2*^
Глибина крипт, мкм	2 тиж.	173±5	168±3	202±5*^
	8 тиж.		140±4*	173±4^
Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок, мкм	2 тиж.	19,5±0,5	20,8±0,6	22,8±0,5*^
	8 тиж.		21,4±0,3*	22,4±0,5*
Висота війчастих епітеліоцитів крипт, мкм	2 тиж.	20,0±0,3	22,8±0,5*	22,9±0,3*
	8 тиж.		18,5±0,3*	17,0±0,3*^
Кількість гранул в опасистих клітинах	2 тиж.	19,2±0,4	19,8±0,5	13,9±0,5*^
	8 тиж.		19,6±0,5	8,0±0,4*^

Примітка.* – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

У цій групі щурів основні зміни в слизовій оболонці мають характер, аналогічний змінам, які відмічали у тварин другої групи. При візуальному мікроскопічному огляді ніяких відхилень гістологічної будови стінки тонкого кишечника виявлено не було. Ворсинки і крипти мають типову нормальну структуру. Товщина слизової оболонки не зазнає достовірних змін, порівняно з контрольною групою піддослідних тварин. Так само висота ворсинок та глибина крипт достовірно не відріз-

няються від групи контролю, і є вищими, порівняно з групою, яка отримувала лише цефтріаксон. Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин ворсинок достовірно вища, ніж у контрольній групі і групі, якій вводили лише цефтріаксон, що свідчить про високий рівень гіпертрофії цих клітин. Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин крипт значно вища, ніж у контрольній групі, проте достовірно не відрізняється від групи, яка отримувала цефтріаксон. Основні морфометричні параметри війчастих епітеліоцитів ворсинок вищі, порівняно з контролем і групою, якій вводили цефтріаксон. Висота війчастих епітеліоцитів крипт і площа перерізу їхніх ядер є проміжними між контрольною групою і групою щурів, які отримували цефтріаксон.

Отже, у тварин, які отримували після антибіотика цефтріаксону пробіотик Симбітер, атрофічні процеси у тонкому кишечнику не виражені, нижчим є ступінь гіпертрофії ентероцитів та келихоподібних клітин, проте дегрануляція опастистих клітин посилюється навіть більше, ніж через два тижні після відміни введення препаратів.

При другому режимі, коли пробіотик Симбітер вводили після 14-добового введення антибіотика цефтріаксону, в **стінці товстої кишки** групи тварин, яким здійснили аутопсію через два тижні після відміни введення препаратів, спостерігаються такі зміни: гістологічна картина при візуальному мікроскопічному огляді виглядає нормальною; всі шари присутні; товщина слизової оболонки не зазнає серйозних змін, порівняно з контрольною групою, і становить в середньому (310 ± 6) мкм; глибина крипт виявляється достовірно нижчою, порівняно з аналогічним показником у тварин контрольної групи; цитологічна будова війчастих епітеліоцитів є нормальною; висота війчастих епітеліоцитів крипт та площа їх поперечного перерізу дещо збільшуються, що може свідчити про активацію цих клітин (табл. 3.8).

Слід відзначити досить значну гіпертрофію слизових келихоподібних клітин, яка підтверджується суттєвим зменшенням площі їх поперечного перерізу. Інтенсивність забарвлен-

ня альціановим синім висока, що є свідченням підвищеної концентрації слизу в келихоподібних клітинах. Кількість гранул в опасистих клітинах не відрізнялась від такої контрольної групи.

Отже, при другому режимі введення препаратів має місце гіпертрофія війчастих епітеліоцитів і келихоподібних клітин.

Таблиця 3.8. Морфометричні параметри слизової оболонки товстої кишки щурів після введення цефтріаксону, а за ним Симбітеру

Ділянка слизової	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф→Сим
Товщина слизової оболонки, мкм	2 тиж.	321±4	318±6*	314±4*^
	8 тиж.		251±3*	285±7*
Глибина крипт, мкм	2 тиж.	223±5	202±3*	199±2*
	8 тиж.		194±4*	206±3*
Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок, мкм	2 тиж.	17,5±0,3	15,8±0,6	17,8±0,6*^
	8 тиж.		11,4±0,3*	17,2±0,8*^
Площа перерізу келихоподібних клітин, мкм	2 тиж.	65,6±3,3	52,0±0,5*	48,3±0,4*
	8 тиж.		59,4±0,3*	57,6±0,5*

Примітка. * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

У стінці товстої кишки щурів, яким здійснили аутопсію через вісім тижнів, при візуальному мікроскопічному огляді гістологічна структура є нормальною. У цієї групи щурів товщина слизової оболонки і глибина крипт займають проміжне положення між аналогічними показниками контрольної групи і групи, тварини, якої отримували лише цефтріаксон. Тобто спостерігається послаблення атрофії, порівняно з групами,

яким вводили цефтріаксон. Зменшується площа поперечного перерізу ядер війчастих клітин, але висота цих клітин не зазнає достовірних змін. Цитологічна будова війчастих епітеліоцитів крипт є нормальною, відновлюється структура келихоподібних клітин, яка майже не відрізняється від контрольних значень (див. табл. 3.8).

Таким чином, при другому режимі введення пробіотика Симбітер і антибіотика цефтріаксону через вісім тижнів після відміни їх введення спостерігають послаблення атрофії келихоподібних клітин та послаблення інших негативних наслідків дії антибіотика на слизову оболонку.

Отже, даний режим введення препаратів приводить до нормалізації мікробіоти тонкої та товстої кишок, а також до відновлення їх морфофункціонального стану [Варенюк І. М., 2014; Варенюк І. М., 2016; Довбинчук Т. В., 2017].

РЕЖИМ III. Одночасне введення пробіотика та антибіотика з продовженням введення пробіотика після відміни антибіотика (Цф+Сим→Сим). Тваринам 1 раз на добу протягом 14 діб внутрішньом'язово вводили антибіотик цефтріаксон, а через 4 год. – перорально пробіотик Симбітер у дозі 160 мг/кг протягом 28 днів (рис. 3.1).

Аналізуючи ефективність одночасного впливу цефтріаксону з Симбітером протягом 14 днів та з продовженням введення Симбітеру до 29 доби на **стан мікробіоти пристінкових біоптатів тонкої та товстої кишок** можна зазначити, що вказаний спосіб використання мультипробіотика виявився найсприятливішим для усунення негативних змін мікробіоти, що відбуваються при введенні цефтріаксону. Привертає увагу значне – максимально відповідне до контрольних значень – збільшення вмісту, як у тонкій, так і у товстій кишці, анаеробних цукролітичних бактерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* 5, а також поява у мікробіоті пристінкового муцину товстої кишки представників роду *Clostridium* (Ig (0,4±0,4) КУО/см²), які є основним продуцентом бутирату, що слугує енергетичним субстратом для епітеліоцитів слизової кишок (табл. 3.9, 3.10).

**Таблиця 3.9. Зміни пристінкової мікробіоти
($M \pm m$ ІgКУО/см²) тонкої кишки щурів через два та
вісім тижнів після сумісного введення цефтріаксону з
Симбітером з продовженням введення Симбітеру ще 14 днів
після відміни введення цефтріаксону**

Мікробіота	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим→Сим
<i>Bifidobacterium</i>	2 тиж.	6,8±0,7	7,5±0,2	6,8±0,8
	8 тиж.	6,4±0,3	4,8±0,2*	6,5±0,8^
<i>Lactobacillus</i>	2 тиж.	4,9±0,4	4,9±0,3	5,0±0,9
	8 тиж.	4,7±0,1	2,9±0,7*	5,0±0,3^
<i>Bacteroides</i>	2 тиж.	1,5±0,3	6,0±0,3*	1,1±0,3^
	8 тиж.	1,0±0,1	4,2±0,8*	0,9±0,2^
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
Умовно-патогенні ентеробактерії	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Staphylococcus spp.</i>	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	0"	0"
<i>Clostridium spp.</i>	2 тиж.	0,4±0,3	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,3	3,0±0,3	0"^\

Примітка. 0" рівень виділення мікроорганізму <10; * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотики цефтріаксон.

Таблиця 3.10. Зміни пристінкової мікробіоти (M±m IgKYO/cm²) товстої кишки щурів через два та вісім тижнів після сумісного введення цефтріаксону з Симбітером з продовженням введення Симбітеру ще 14 діб після відміни введення цефтріаксону

Мікробіота	Тер-мін	Дослідна група		
		інтакт-ний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим→Сим
<i>Bifidobacterium</i>	2 тиж.	6,4±0,2	4,1±0,2*	6,1±0,5
	8 тиж.	6,4±0,8	4,8±0,2*	6,4±0,1
<i>Lactobacillus</i>	2 тиж.	4,9±0,1	4,0±0,3	4,6±0,8
	8 тиж.	4,9±0,1	2,9±0,2*	5,0±0,1
<i>Bacteroides</i>	2 тиж.	2,3±0,1	3,1±0,3	0,8±0,2
	8 тиж.	2,3±0,1	0,6±0,8	0,1±0,1
<i>Escherichia coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	2 тиж.	2,0±0,1	0"	0"
	8 тиж.	2,2±0,1	0"	0"
<i>Escherichia coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	2 тиж.	1,6±0,2	0"	0"
	8 тиж.	1,6±0,2	0"	0"
Умовно-патогенні ентеробактерії	2 тиж.	0"	0"	0"
	8 тиж.	0"	5,0±0,1*	0"
<i>Staphylococcus spp.</i>	2 тиж.	0,5±0,2	1,5±0,8*	1,4±0,1
	8 тиж.	0,5±0,2	3,1±0,1*	1,0±0,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 тиж.	0,4±0,1	0"	0,2±0,2
	8 тиж.	0,4±0,1	2,1±0,1	0,2±0,2
<i>Clostridium spp.</i>	2 тиж.	0,4±0,3	0"	0"
	8 тиж.	0,4±0,3	3,0±0,3*	0,4±0,4

Примітка. 0" рівень виділення мікроорганізму <10; * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі; ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

При візуальному мікроскопічному огляді **тонкої кишки** через два тижні після закінчення схеми введення препаратів відслідковується тенденція до атрофічних процесів. Товщина слизової оболонки та глибина крипт є меншими, порівняно з контрольною групою. Висота ворсин займає проміжне положення між контрольною групою і групою, яка отримувала цефтріаксон. Висота ентероцитів ворсин та площа поперечного перерізу їхніх ядер вища, порівняно з контрольною групою та групою, яка отримувала тільки цефтріаксон. Висота ентероцитів крипт та площа поперечного перерізу їхніх ядер займають проміжне положення між групою, яка отримувала цефтріаксон, і контрольною групою.

Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин крипт достовірно не відрізняється від контрольної групи. Келихоподібні клітини, розташовані в криптах, є дещо гіпертрофованими. Кількість гранул в опасистих клітинах не знижена.

Через вісім тижнів після закінчення введення обох препаратів гістологічна картина слизової оболонки стінки тонкої кишки при візуальному мікроскопічному огляді виглядає нормальною, атрофічні процеси майже не виражені. Товщина слизової оболонки та висота ворсин є проміжними, порівняно з контрольною групою та групою, яка отримувала цефтріаксон, а глибина крипт є навіть вищою, ніж у тварин контрольної групи. Ентероцити у ворсинах та криптах виглядають нормальними, виміряні морфометричні параметри цих клітин (за винятком площі перерізу ядер ентероцитів у криптах) перебувають на рівні контрольних показників (табл. 3.11). Слизові келихоподібні клітини дещо гіпертрофовані, оскільки збільшена площа їх поперечного перерізу. Інтенсивність забарвлення цих клітин можна охарактеризувати як середню, секрет розподілений по клітині рівномірно. Кількість гранул в опасистих клітинах знижена (табл. 3.11).

Отже, при третьому режимі введення пробіотка Симбітер і антибіотика цефтріаксон у слизовій оболонці стінки тонкої кишки атрофія слабо виражена, слизові клітини дещо гіпертрофовані, а основні морфометричні параметри вільчастих епі-

теліоцитів не відрізняються від аналогічних показників контрольної групи. Тому можна вважати, що третій режим дозволяє практично повністю усунути негативні наслідки впливу антибіотика цефтріаксону на стінку тонкої кишки.

Таблиця 3.11. Морфометричні параметри слизової оболонки тонкої кишки щурів після комбінованого введення цефтріаксону та Симбітеру при введенні Симбітеру після 14-добового введення цефтріаксону

Ділянка слизової	Термін	Дослідна група		
		інтактний контроль	введення цефтріаксону	введення Цф+Сим→Сим
Товщина слизової оболонки, мкм	2 тиж.	541±7	423±6*	414±7*
	8 тиж.		471±3*	505±6*^
Висота ворсинок, мкм	2 тиж.	231±4	148±4*	166±4*^
	8 тиж.		175±3*	179±5*
Глибина крипт, мкм	2 тиж.	173±5	168±3	150±3*^
	8 тиж.		140±4*	192±4*^
Висота війчастих епітеліоцитів ворсинок, мкм	2 тиж.	19,5±0,5	20,8±0,6	24,0±0,4*^
	8 тиж.		21,4±0,3*	19,2±0,5^
Висота війчастих епітеліоцитів крипт, мкм	2 тиж.	20,0±0,3	22,8±0,5*	21,7±0,3*
	8 тиж.		18,5±0,3*	19,3±0,4

Примітка. * – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у контрольній групі); ^ – P<0,05 порівняно з відповідним параметром у групі, яка отримувала антибіотик цефтріаксон.

При мікроскопічному дослідженні гістологічної будови стінки товстої кишки виявлено, що вона має типову будову, спостерігається лише незначне зростання висоти війчастих епітеліоцитів крипт та площі поперечного перерізу їхніх ядер,

що може свідчити про активацію цих клітин. Цитологічна будова війчастих епітеліоцитів така ж, як у контрольній групі.

Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин збільшилася, порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон, тобто в даному випадку можемо говорити про ослаблення атрофічних процесів.

Кількість гранул в опасистих клітинах збільшувалася на 13,02 % ($P < 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи, що свідчить про їх стабілізацію, порівняно з попередньою схемою.

Отже, за такого режиму введення пробіотику Симбітер і антибіотика цефтріаксону в тварин даної групи спостерігаються гіпертрофія слизової оболонки та послаблення атрофії келихоподібних клітин.

Через вісім тижнів після припинення введення препаратів при візуальному мікроскопічному огляді гістологічна структура стінки товстої кишки виглядає незмінною. Величини таких параметрів як товщина слизової оболонки та глибина крипт займають проміжне положення між контрольною групою і групою, якій вводили лише цефтріаксон (рис. 3.6).

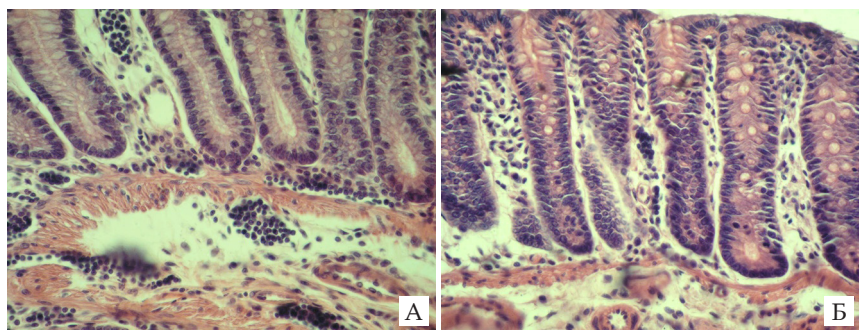


Рис. 3.6. Ступінь лейкоцитарної інфільтрації та стан кровоносних судин у стінці товстої кишки після впливу антибіотика цефтріаксону (А) та після введення антибіотика (з 1-ї до 14-ї доби) та пробіотику Симбітер (з 1-ї до 29-ї доби) (Б), III схема.

Забарвлення гематоксиліном Бемера та еозином.

Збільшення: об. $\times 40$, ок. $\times 10$. А – цефтріаксон \pm Симбітер, III схема;
Б – цефтріаксон.

Тобто, в цій групі наявна тенденція до послаблення атрофічних процесів, які були спричинені застосуванням цефтріаксону, проте повного відновлення не спостерігається. Висота війчастих епітеліоцитів збільшується як порівняно з контролем, так і з групою, якій вводили цефтріаксон. Площа поперечного перерізу ядер війчастих епітеліоцитів суттєво зменшується (табл. 3.12). Цитологічна будова війчастих епітеліоцитів є нормальною.

Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин зростає й стає навіть трохи більшою, ніж у контрольній групі, тобто ці клітини мають тенденцію до гіпертрофії. Їхня функціональна активність підвищується, про що також свідчить інтенсивність забарвлення вмісту цих клітин альціановим синім.

Кількість гранул в опасистих клітинах знову зменшилась, порівняно з контролем, на 10,9 % ($P < 0,05$).

Отже, введення пробіотики Симбітер разом із цефтріаксоном протягом 14 діб і продовження введення пробіотики протягом наступних 14 діб дозволяє зменшити або навіть повністю усунути атрофію слизової оболонки товстої кишки та слизових келихоподібних клітин.

Отже, ефективність застосування пробіотики Симбітер для усунення негативних наслідків від введення антибіотику цефтріаксону залежить від режиму його введення. Введення пробіотики Симбітер разом із антибіотиком цефтріаксоном протягом 14 діб і одночасна відміна обох препаратів є мало-ефективною для усунення негативних наслідків від введення антибіотику. Два інших режими ведення: 2) введення пробіотики Симбітер протягом 14 діб після 14-добового введення антибіотику цефтріаксону (тобто, протягом 14 діб після відміни антибіотику), 3) введення пробіотики Симбітер разом з антибіотиком цефтріаксоном протягом 14 діб і продовження введення пробіотики протягом наступних 14 діб є значно ефективнішим і дозволяє зменшити ступінь атрофії слизової оболонки тонкої кишки та ступінь гіпертрофії слизових келихоподібних клітин, однак мало впливає на відновлення опасистих клітин [Dovbinchuk T., 2018; Путніков А. В., 2017].

3.2. Клінічні дослідження ефективності мультипробіотика Симбітер для запобігання віддаленим наслідкам лікування антибіотиками широкого спектра дії у дітей

Незважаючи на велику кількість досліджень, присвячених застосуванню пробіотиків при лікуванні гострих діарей, питання про доцільність їх використання досі залишається дискусійним. У Великій Британії при лікуванні гострих гастроентеритів у дітей призначати пробіотики не рекомендується до отримання чітких даних про ефективність і безпечність їх використання [National Institute for Health and Clinical Excellence, 2009; Managing acute gastroenteritis among children, 2003]. Відсутні рекомендації з використання пробіотиків при лікуванні гострої діареї і в керівництві ВООЗ [Guarino A., 2009]. Натомість в керівництвах ESPGHAN і Європейського товариства дитячих інфекційних хвороб (ESPID) рекомендується призначення пробіотиків як допоміжної терапії при лікуванні дітей із гострими гастроентеритами [Guarino A., 2008], але зазначається, що на сьогоднішній день тільки два пробіотичних штами показали достатній рівень ефективності та безпеки: *Lactobacillus rhamnosus* GG (I, A) і *Saccharomyces boulardii* (II, B). Рекомендації з використання пробіотиків є і в українському протоколі лікування дітей із гострими кишковими інфекціями.

Для підтвердження ефективності профілактичної дії пробіотика Симбітер ацидофільний ми провели обстеження 40 дітей у віці від 3 до 17 років, які отримували лікування з приводу гострої інфекційної патології на базі клініки дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Всіх хворих поділили на 2 групи:

1 група – діти, які на фоні введення антибіотиків не отримували жодних пребіотичних та пробіотичних препаратів;

2 група – діти, які паралельно з антибіотиками отримували мультпробіотик Симбітер ацидофільний концентрований.

Розподіл хворих за статтю, діагнозом, тривалістю антибактеріальної терапії наведено в таблиці 3.13. Інфекційний діаг-

ноз встановлювали на підставі клінічних та лабораторних даних відповідно до протоколів діагностики та лікування інфекційних захворювань у дітей МОЗ України. У дітей з менінгоковою інфекцією та псевдотуберкульозом захворювання мало тяжкий перебіг, у решти дітей – середнього ступеня тяжкості. Всі пацієнти з першого дня госпіталізації отримували антибіотик із групи цефалоспоринів (цефтріаксон). Тривалість терапії, залежно від діагнозу та тяжкості стану хворого, складала 7 або 14 днів (табл. 3.12). Різниця між пацієнтами 1 і 2 груп за статтю, діагнозом та тривалістю антибактеріальної терапії була недостовірною ($p>0,05$).

Таблиця 3.12. Розподіл хворих за статтю, діагнозом та тривалістю антибактеріальної терапії

Показник	1 група (контроль), абс, %	2 група (Симбітер), абс, %
Розподіл за статтю		
Хлопчики	9 (45,0)	8 (40,0)
Дівчатка	11 (55,0)	12 (60,0)
Розподіл за діагнозом		
Гострий лакунарний тонзиліт	17 (85,0)	16 (80,0)
Менінгокова інфекція менінгококцемія гнійний менінгіт	– 1 (5,0)	1 (5,0) –
Псевдотуберкульоз	1 (5,0)	1 (5,0)
Бореліоз	1 (5,0)	2 (10,0)
Тривалість антибактеріальної терапії		
7 днів	17 (85,0)	16 (80,0)
14 днів	3 (15,0)	4 (20,0)

Симбітер ацидофільний концентрований призначали по 1 дозі 1 раз на добу з першого дня призначення антибіотика.

Інтервал між введенням пробіотику та антибіотиків становив не менше 4 годин. Мультипробіотик дітям 2 групи призначали протягом всього курсу антибіотикотерапії та ще впродовж 10 днів після відміни антибіотика. Після закінчення курсу антибактеріальної дітей 1 групи поділили на 2 підгрупи: 1а і 1б. Дітям підгрупи 1а пре- та пробіотичних препаратів призначали, а дітям підгрупи 1б призначили Симбітер ацидофільний концентрований на 10 днів.

У першу добу після госпіталізації, на наступний день після останньої дози антибіотика і через 1 місяць після закінчення курсу антибактеріальної терапії в обстежуваних дітей збирали фекалії для визначення рівнів секреторного імуноглобуліну А (sIgA) та мієлопероксидази (МПО).

Протягом курсу антибактеріальної терапії прояви діареї були у 30 % дітей контрольної групи (табл. 13). Прояви діареї з'являлись з 3 по 6 день від початку введення антибіотиків і зберігалися від 2 до 6 днів. При цьому частота дефекацій коливалась від 2 до 5 разів на добу, випорожнення ставали рідкими, часто з домішками невеликої кількості слизу. Стан хворих з появою діареї не погіршувався, підвищення температури та зростання лейкоцитозу у крові не спостерігалось. Антибактеріальну терапію при появі діареї продовжували, але проводили корекцію харчування, збільшували кількість пиття, додавали сорбенти. У дітей, які отримували Симбітер ацидофільний, прояви діареї були відсутні ($p < 0,05$).

Таблиця 3.13. Частота діареї у дітей на фоні антибактеріальної терапії

Показник	1 група (контроль)	2 група (Симбітер)
Кількість дітей, абс, %	6 (30,0)	0*

Примітка. * – різниця, порівняно з групою, яка приймала лише антибіотик, достовірна, $p < 0,05$.

Результати бактеріологічного дослідження фекалій дітей одразу після курсу антибактеріальної терапії представлені в таблиці 3.14.

Таблиця 3.14. Дані бактеріологічного дослідження фекалій у дітей після закінчення курсу антибактеріальної терапії

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів (lg КУО/см ²)		
	норма	1 група (контроль)	2 група (Симбітер)
Загальна кількість <i>E. coli</i>	6–9	7,4±1,2	8,25±0,12*
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	до 6	3,0±2,5	0*
<i>E. coli</i> з гемолітичними властивостями	0–5 %	29,4# або у 25 % дітей	0*
<i>Lactobacillus</i>	>6	6,3±1,0	7,0±0,9
<i>Bifidobacterium</i>	>7–8	7,6±1,1	8,0±0,9
<i>Candida sp.</i>	до 4	4,3±2,5	3,0±2,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	до 4	1,75±2,1	0*
Умовно-патогенні ентеробактерії (клебсіела, протей)	до 6	1,5±1,9	0

Примітка. * – різниця, порівняно з групою, яка приймала лише антибіотик, достовірна, $p < 0,05$; # – різниця порівняно з референтними значеннями, достовірна, $p < 0,05$.

Як видно з таблиці 3.15, одразу після курсу антибактеріальної терапії в просвітній флорі кишечника відбувались переважно якісні зміни: зростала кількість грибів роду *Candida* та кишкової палички зі зміненими властивостями. При додаванні мультипробіотика Симбітер спостерігалась тенденція до збільшення загальної кількості кишкової палички ($p < 0,05$) та біфідобактерій, стримувався ріст умовно-патогенної флори (стафілококів, клебсіел) й кишкових паличок зі зміненими властивостями ($p < 0,05$).

Отримані в ході дослідження показники секреторного імуноглобуліну А (sIgA) порівнювали з показниками здорових

донорів: для дітей до 8 років життя – (28,7±15,5) мкг/г, для старших дітей – (115,97–317,39) мкг/г. Для зручності опису рівні здорових донорів приймали за норму.

Таблиця 3.15. Рівень секреторного імуноглобуліну А в копрофільтратах дітей на фоні антибактеріальної терапії

Рівень sIgA	Кількість дітей, абс, %			
	1 група (контроль)		2 група (Симбітер)	
	А	В	А	В
Норма	14 (70,0)*	7 (35,0)*#	13 (65,0)*	19 (95,0)*#
Вище норми	3 (15,0)*	10 (50,0)*#	4 (20,0)	1 (5,0)#
Нижче норми	3 (15,0)	3 (15,0)	3 (15,0)	-
Всього	20 (100)	20 (100)	30 (100)	20 (100)

Примітка. А – до початку антибактеріальної терапії; В – після закінчення курсу антибактеріальної терапії; * – різниця між первинним та повторним дослідженнями достовірна, $p < 0,05$; # – різниця між 1 та 2 групами достовірна, $p < 0,05$.

Як видно з даних, наведених у таблиці 3.16, вихідні рівні sIgA відповідали рівню здорових донорів у 70,0 % дітей контрольної групи і у 65,0 % дітей другої групи. У 15–20 % дітей у групах спостереження вихідні рівні sIgA перевищували показники здорових донорів. За даними літератури, підвищені рівні sIgA в фекаліях виявляють у дітей із дисбіозом кишечника, з хронічною патологією шлунково-кишкового тракту, з алергічними захворюваннями, у дітей, які часто хворіють [Холодова І. Н., 2003; Конаныхина С. Ю., 2011]. У нашому дослідженні всі діти з підвищеним рівнем sIgA при надходженні мали хронічні захворювання ЛОР-органів або шлунково-кишкового тракту (хронічний тонзиліт, холецистит, гастродуоденіт). Після курсу антибактеріальної терапії кількість дітей з нормальним рівнем sIgA в фекаліях серед хворих контрольної 1 групи знизилась із 70,0 % до 35,0 % ($p < 0,05$). При цьому зросла кількість пацієнтів із підвищеним рівнем sIgA (з 15,0 % до 50,0 % дітей, $p < 0,05$). Підвищення рівня sIgA в фекаліях на фоні антибактеріальної

терапії вказує на формування неспецифічної імунної відповіді з боку слизової оболонки і може бути викликано дисбіотичними змінами в кишечнику: зниженням кількості нормофлори (лактобактерій, біфідобактерій) при збільшенні умовно-патогенних та / або патогенних мікроорганізмів. При проведенні кореляційного аналізу встановлено, що рівень підвищення sIgA прямо пропорційно збігався з ростом кількості клебсієл ($r_s=0,857$, $p<0,05$) та *Staphylococcus aureus* ($r_s=0,81$, $p<0,05$). Також тенденція до зростання рівня секреторного імуноглобуліну А спостерігалась при зниженні числа лактобактерій менше 10^5 та загальної кількості кишкової палички менше 10^6 ($p>0,05$). Первинно знижені показники sIgA у трьох дітей контрольної групи в динаміці не змінювались. Збереження низьких цифр секреторного IgA може вказувати на знижену резистентність організму і такі діти потребують поглибленого імунологічного обстеження для проведення імунокорегуючої терапії. При застосуванні Симбітеру (2 група) рівень секреторного імуноглобуліну нормалізувався у 19 (95 %) пацієнтів і у 1 (5,0 %) хворого перевищував вікові значення. Порівняно з контрольною групою, кількість дітей з нормальними показниками sIgA серед дітей 2 групи вірогідно переважала ($p<0,05$). У всіх дітей зі зниженими показниками sIgA після вживання Симбітеру ці показники нормалізувалися, що може бути пов'язано з імуномодулювальним впливом пробіотиків [Ермоленко Е., 2014]. Виявлені кореляційні зв'язки між рівнем sIgA та кількістю клебсієл і золотистого стафілокока дозволяють розглядати цей показник як один із маркерів наявності дисбіотичних змін в кишечнику.

Мієлопероксидаза є однією з ланок антимікробної активності фагоцитів, яка забезпечує неспецифічний вроджений імунітет. Мієлопероксидаза переважно знаходиться в азурофільних гранулах нейтрофілів, у незначній кількості мієлопероксидаза може виявлятися у моноцитах і деяких тканинних макрофагах. Після активації нейтрофілів відбувається їх дегрануляція і вихід мієлопероксидази в фагосому або в позаклітинний простір [Malle E., 2007]. У живому організмі у поза-

клітинний простір мієлопероксидаза вивільняється при лізисі клітин, при неможливості нейтрофілом фагоцитувати мішень або за рахунок впливу різноманітних розчинних факторів на нейтрофілів. Визначення рівня мієлопероксидази у фекаліях використовують для визначення активності запальних захворювань кишечника чи окислювального стресу. В нашому дослідженні у дітей обох груп первинні рівні мієлопероксидази в фекаліях були підвищеними (рис. 3.7). Це може бути зумовлено наявністю гострої інфекційної патології, терапія якої супроводжувалася зниженням рівня мієлопероксидази в динаміці. При цьому вживання Симбітеру суттєво не впливало на цей процес. Таким чином, кореляції між даними бактеріологічного дослідження, визначення рівня sIgA і показниками мієлопероксидази у фекаліях ми не виявили.

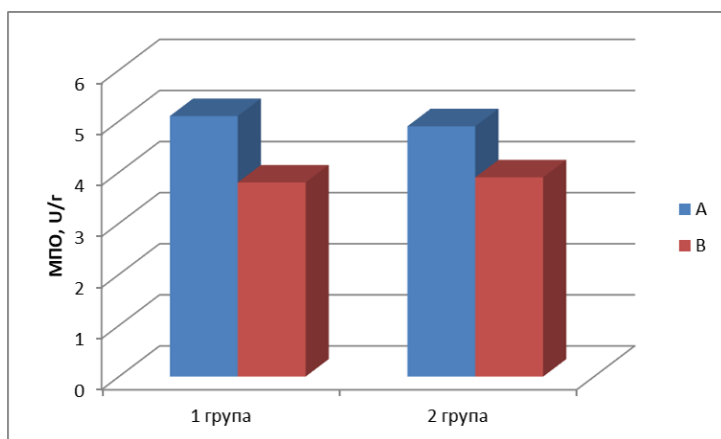


Рис. 3.7. Рівні мієлопероксидази у копрофільтратах дітей, які отримували антибактеріальну терапію: А – до початку антибактеріальної терапії; В – після закінчення курсу антибактеріальної терапії.

У літературних джерелах ми не знайшли даних з вивчення рівня мієлопероксидази в фекаліях при дисбіозах чи на фоні антибактеріальної терапії, а дані щодо рівнів мієлопероксидази в нейтрофілах крові при дисбіозі кишечника суперечливі.

Медведева О. А. описує зростання рівня мієлопероксидази в нейтрофілах на фоні експериментального дисбіозу кишечника і вірогідне зниження цих показників при застосуванні лактобактерій [Медведева О. А., 2011]. В іншій роботі, навпаки, виявляли зниження рівня мієлопероксидази в нейтрофілах крові у дітей з кишковим дисбіозом на фоні хронічного гастродуоденіту з наступним зростанням мієлопероксидази при лікуванні дисбіозу [Назаретян В. Г., 2005]. Суперечливість цих даних вказує на необхідність проведення додаткових досліджень.

Через місяць після відміни антибіотиків у дітей, які не отримували препаратів для підтримки мікробіоценозу кишечника, в динаміці збільшилася кількість *Staphylococcus aureus* ($p < 0,05$) та грибів роду *Candida* при збереженні підвищеної кількості кишкових паличок з гемолітичними властивостями (табл. 3.15). У дітей, які почали приймати Симбітер після курсу антибіотиків, в динаміці спостерігалася тенденція до зростання загальної кількості *E. coli*, лактобактерій, зменшилося число кишкових паличок зі зміненими ферментативними властивостями ($p < 0,05$). Порівняно з результатами бактеріологічного дослідження фекалій дітей 1а групи (контроль), у дітей 1б групи через 1 місяць після відміни антибіотиків достовірно знизилась кількість *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями та *Staphylococcus aureus*, спостерігалась тенденція до зниження кількості грибів та клібсіел, в 2 рази зменшилось число пацієнтів, у яких висівалась кишкова паличка з гемолітичними властивостями (табл. 3.15). Цікаво, що через місяць після відміни антибіотиків збільшилось число дітей, у яких виділявся гемолітичний стафілокок в кількості $10^4 - 10^6$, при цьому застосування Симбітеру гальмувало цей процес ($p < 0,05$). У дітей 2 групи дані бактеріологічного дослідження фекалій в динаміці практично не змінились і залишались у межах референтних значень (табл. 3.15).

Таблиця 3.15. Дані бактеріологічного дослідження фекалій у дітей через 1 місяць після закінчення курсу антибактеріальної терапії

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів (lg КУО/см ²)			
	норма	1а група (контроль)	1б група	2 група (Симбітер)
Загальна кількість <i>E.coli</i>	6–8	7,6±1,2	7,9±0,8	8,2±0,12
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	до 6	2,3±2,5	0,8±1,9*	0*
<i>E. coli</i> з гемолітичними властивостями	0–5 %	29,4 (у 25 % дітей)	14 % (у 12,5 % дітей)	0*
<i>Lactobacillus</i>	>6	6,3±1,0	6,5±0,9	6,8±1,1
<i>Bifidobacterium</i>	>7–8	7,6±1,1	7,7±0,9	8,0±1,0
<i>Candida sp.</i>	до 4	4,7±2,8	3,9±2,1	3,0±2,1*
<i>Staphylococcus aureus</i>	до 4	5,7±1,1	2,3±2,1*	0,5±2,1*#
Умовно патогенні ентеробактерії (клебсіела, протей)	до 6	1,5±1,9	0	0

Примітки: * – різниця порівняно з групою 1а достовірна, $p < 0,05$; # – різниця порівняно з групою 1б достовірна, $p < 0,05$.

Отже, дисбіотичні зміни в кишечнику, викликані вживанням антибіотиків, не зникали після відміни препаратів, а в динаміці навіть поглиблювалися за рахунок росту умовно патогенної флори (переважно грибів роду *Candida* та *Staphylococcus aureus*). Десятиденний курс Симбітеру після закінчення антибактеріальної терапії сприяв відновленню нормофлори кишечника, але повністю не ліквідував усі наслідки негативного впливу антибіотиків. Застосування мультипробіотика Симбітер на фоні антибіотиків запобігало розвитку дисбіотичних змін у кишечнику, а продовження вживання Симбітеру протягом 10 днів після відміни антибіотиків закріплювало цей ефект.

ВИСНОВКИ

З урахуванням віддаленої динаміки (через 2 та 8 тижнів спостереження) мікробіологічних та гістологічних критеріїв оцінки стану приепітеліальних біоплівок та епітелію тонкої та товстої кишок лабораторних щурів, а також клінічно підтверджених результатів, отриманих на базі кафедри дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, можна стверджувати, що схема профілактичного одночасного використання антибіотика цефтріаксону з мультипробіотиком Симбітер ацидофільний є малоефективною. Найкращі показники відновлення змін мікробіологічного, гістологічного та імунологічного характеру, що відбуваються після використання цефтріаксону, отримано за схеми одночасного введення цефтріаксону з мультипробіотиком Симбітер ацидофільний із продовженням його введення (10–14 діб) після відміни антибіотика. Дещо менш ефективною є схема використання мультипробіотика тільки після відміни введення антибіотика.

Список використаних джерел

1. Багиров Н.С., Петухов И.Н., Дмитриев Н.В., Григорьевская З.В. Микробиом и рак: есть ли связь? Обзор литературы. Злокачественные опухоли 2018;3s1:56–69;

2. Варенюк І. М., Дзержинский М. Е. Довбинчук Т. В. та ін. Вплив цефтріаксону на продукцію слизу келихоподібними клітинами слизової оболонки кишечника. Молодь і поступ біології: Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів; 2016. С. 305-306.

3. Варенюк І.М., Дзержинський М. Е., Путніков А. В. та ін. Комплексна оцінка механізмів розвитку запального процесу товстої кишки на тлі застосування антибіотикотерапії та його профілактика мультипробіотиком «Симбітер» Імунологія та алергологія. Наука і практика. 2014;1:83.

4. Волкова Н.И, Ганенко Л.А., Головин С.Н., роль микробиоты в развитии ожирения и его метаболического профиля (Часть II). Медицинский вестник Северного Кавказа. 2019;14(2): 391-396

5. Довбинчук Т. В. Путніков А. В. Сергійчук Т. М. Толстанова Г. М. Отдаленные последствия антибиотикотерапии мультипробіотиком «Симбітер» ацидофильный концентрированный Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2013: 128.

6. Довбинчук Т. В., Сергійчук Т. М., Стецька В. О. та ін. Віддалені наслідки введення цефтріаксону на проникність епітелію та склад просвітної мікробіоти товстої кишки щурів. Молодь і поступ біології: Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів; 2017. С. 269-270

7. Довбинчук Т.В., Путніков А.В., Сергійчук Т.М. та ін. Ефективність різних режимів використання симбітеру в лабораторних та клінічних умовах. Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань: Науково-практична конференція; 2015. С. 38

8. Ермоленко Е. Иммуномодулирующее действие пробиотических бактерий при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Вестник Санкт-Петербургского университета; 2014. С. 5-26.

9. Конаныхина С.Ю., Сердюк О.А. Нифурател в лечении дисбактериоза у детей: эффективность и перспективы применения. Поликлиника. 2011;(1): 66-68

10. Медведева О.А., Калуцкий П.В., Беседин А.В. Влияние лактобактерина на пристеночную микрофлору толстого кишечника и функциональную активность нейтрофилов крови мышей при

экспериментальном лекарственном дисбиозе в условиях воздействия магнитного поля//Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». 2011;1:10-15

11. Назаретян В.Г. Кишечный дисбиоз при хроническом гастродуодените у детей и его коррекция. Автореф. дис. д.м.н.-Москва, 2005.

12. Пutnikov A.B., Golota Ю.В., Кришук А.Ю., и др. Микробиоценоз биопленки толстой кишки крыс в разные сроки после введения цефтриаксона Медицинский академический журнал. Санкт-Петербург. 2012: 311-313.

13. Путніков А.В, Варенюк І.М., Рослова Н.М. та ін. Структурні та функціональні особливості слизової оболонки тонкої кишки залежно від кількісного та якісного складу мікробіоти. Фізіол. журн. 2017;63(6): 72-84.

14. Путніков А.В., Голота Ю.В., Сергійчук Т.М., та ін. Кількісні та функціональні показники кишкової нормобіоти щурів Мікробіологія і біотехнологія. 2015;(2): 89-100.

15. Турчина М.С., Королева Л.Ю., Букреева М.В., Ерофеева М.В., Борзова Д.В. Взаимосвязь пищевой аллергии и состава кишечной микробиоты при синдроме раздраженной толстой кишки. Медицинский алфавит. 2019;2(13): 39-42.

16. Холодова И.Н., Ильенко Л.И., Демин В.Ф. и др. Новые возможности диагностики и лечения дисбиотических нарушений кишечника у детей. РМЖ. 2003;(11): 20-24

17. Шендеров Б., Голубев В., Данилов А., Прищепа А. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные заболевания. Поликлиника. 2016;(1): 7-13.

18. Широбоков В.П., Янковский Д.С., Дымент Г.С. Новые стратегии в области создания и клинического использования пробиотиков. Вісник фармакології та фармації. – 2010. - №2. – С.18-30.

19. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Эра пробиотиков. Противоречия, проблемы, дискуссии. Колега. 2005; 3; 4. 118 с.

20. Янковский Д.С., Широбоков В.П., Дімент Г.С. МИКРОБИОМ. – Киев: ФЛП ВЕРЕС О.И. 2017; 640.

21. Aihara E, Engevik KA, Montrose MH. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. Annu Rev Physiol. 2017;79: 357 – 80.

22. Bercik P, Collins S, Verdu E. Microbes and the gut-brain axis. Neurogastroenterol. Motil. 2012;24(5): 405–13

23. Beregova T. et al. Effectiveness of multiprobiotic “Symbiter® acidophilus” to prevent antibiotic-induced hepatic and colonic

dysfunction. Proceedings and abstracts of 7th international conference "Probiotics, prebiotics and new foods; 2013. P. 145.

24. Bleich M, Ecke D, Schwartz B et al. Effects of the carcinogen dimethylhydrazine (DMH) on the function of rat colonic crypts. *Pflugers Arch.* 1997;433: 254-59.

25. Caminer, A. C., Haberman, R. & Scher, J. U. Human microbiome, infections, and rheumatic disease. *Clin. Rheumatol.* 2017;36: 2645-2653.

26. Carter G.P., Rood J.I., Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease: past and present perspectives. *Gut Microbes* 2010;1:58-64.

27. Dovbinchuk T, Sergiychuk T, Stetska et al. Long-term effects of antibiotic agents on colonic microbiota and epithelium permeability in rats. Abstract of 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School; 2018. C. 37.

28. Dovbinchuk T., Putnikov A, Serhiichuk T, Tolstanova G. Probiotic prophylactic measures and therapy antibiotic-associated changes fecal and microflora of the rats colon. II international symposium "molecular mechanisms of synaptic transmission regulation"; 2012. P. 41.

29. Guarino A., Albano F., Ashkenazi S. et al. Expert Working Group. The ESPGHAN/ESPID evidenced-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008;46(2): 81-122.

30. Guarner F., Malagelada J. R.. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361: 512-519

31. Hajela N, Nair G, Abraham P, Ganguly P, Nirmal K. Health impact of probiotics - vision and opportunities. *Gut Pathog.* 2012;4(1): 1.

32. Johansson M., Ambort D., Pelaseyed T., et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:3535-641.

33. Knoop KA, McDonald KG, Kulkarni DH, Newberry RD. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut.* 2016;65(7):1100-109.

34. Kuhn K.A, Stappenbeck TS. Peripheral education of the immune system by the colonic microbiota. *Semin Immunol.* 2013;25(5):364-69.

35. Kunz A. N., Noel J. M. & Fairchok M. P. Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2004;38, 457-458.

36. Lyras D., et al. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 2009;458:1176-1179; 43.

37. Makkink M, Schwerbrock N, Mähler M et al. Fate of goblet cells in experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2002;47: 2286 – 297.
38. Malle E., Furtmuller P.G. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British journal of Pharmacology.* 2007;152: 838-854.
39. Managing acute gastroenteritis among children // *MMWR (CDC).* 2003;52: 1-16.
40. McDole J.R., Wheeler L.W., McDonald K.G., Wang B., Konjufca V., Knoop K.A., Newberry R.D., and Miller M.J. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ DCs in the small intestine. *Nature.* 2012;483(7389): 345-49.
41. National Institute for Health and Clinical Excellence. Diarrhoea and vomiting in children. Diarrhoea and vomiting caused by gastroenteritis: diagnosis, assessment and management in children younger than 5 years. April 2009.
42. Oudhuis G. J., Bergmans D.C.J.J. & Verbon, A. Probiotics for prevention of nosocomial infections: efficacy and adverse effects. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2011;17, 487-492.
43. Putnikov A., Furzikova T., Vareniuk I., et al. The beneficial effect of multiprobiotic “symbither acidophilic” on ceftriaxone-induced inflammation in rat colon. // 21 United European Gastroenterology Week (12-16 october 2013; Berlin (Germany)). / *UEG journal*; 2013. P. 1(1): A57-A58 (OP189).
44. Rinne M, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects on gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nut.* 2006;43(2):200-5.
45. Salminen M. K. et al. Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38, 62-69.
46. Suez J. et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell.* 2018;174:1406-1423.e16.
47. Szajewska H. Short- and long-term effects of probiotics administered early in life Nestlé Nutr Inst Workshop Ser Pediatr Program. 2011;68: 65-82.
48. Yelin I. et al. Genomic and epidemiological evidence of bacterial transmission from probiotic capsule to blood in ICU patients. *Nature Medicine.* 2019;25: 1728-1732.

РОЗДІЛ 4

РОЛЬ TRP КАНАЛІВ У ПІДТРИМАННІ ГОМЕОСТАЗУ КИШЕЧНИКА (перспективи для подальших досліджень)

О. В. Жолос, Г. М. Толстанова

Серед різних молекулярних механізмів, які забезпечують нормальне функціонування шлунково-кишкового тракту й порушення яких може мати значні патофізіологічні наслідки, в останні роки значна увага приділяється суперродині Ca^{2+} -проникних катіонних TRP каналів (канали транзйєнтного рецепторного потенціалу – Transient Receptor Potential channels). Це друга за численністю (після калієвих каналів) і остання з ідентифікованих родин іонних каналів [Clapham et al., 2005; Venkatachalam & Montell, 2007]. Варто підкреслити, що саме іонним каналам зараз приділяється значна увага у пошуку новітніх молекулярних мішеней для лікування різних патофізіологічних станів. Така увага до цих білків зумовлена тим, що іонні канали беруть участь не тільки в різноманітних клітинних функціях, а і знаходяться в найбільш легкодоступному місці для дії лікарських препаратів – на поверхневій (плазматичній) мембрані клітин. Нещодавній аналіз 893 молекулярних мішеней і 1578 лікарських засобів, дозволених FDA, показав, що як молекулярні мішені іонні канали, разом із кіназами і спряженими з G-білками рецепторами, є «привілейованим» класом молекулярних мішеней. Разом ця група складає 41 % всіх мішеней для лікування захворювань, а серед них майже половина, або 19 % від всіх фармако-таргетних білків в організмі людини, це іонні канали [Santos et al., 2016].

Це пов'язано з тим, що дисфункція іонних каналів призводить до порушення як регуляції мембранного потенціалу

і електричних процесів (таких як генерація потенціалів дії у збудливих клітинах), так і гомеостазу внутрішньоклітинного кальцію (вхід та / або вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо забезпечується саме відкриванням кальцій-проникних іонних каналів). Оскільки кальцій є ключовим вторинним посередником у регуляції практично всіх клітинних процесів, прикладами чого можуть бути м'язове скорочення, секреція, формування та підтримання міжклітинних контактів (що дуже важливо для регульованої бар'єрної функції епітелію та ендотелію), диференціювання, проліферація, апоптоз клітин тощо, стає зрозуміло, чому сьогодні така значна увага приділяється питанням експресії та функції цих мембранних пороутворюючих білків як в нормі, так і за умов патології. Крім того, останнім часом з'являється все більше даних, які свідчать про наявність TRP каналів не тільки в плазматичній мембрані чи мембранах ендо(сарко)плазматичного ретикулуму, а й в різних внутрішньоклітинних органелах, зокрема в лізосомах, що важливо для регуляції «внутрішньоклітинного травлення» [Dong et al., 2010; Samie & Xu, 2011; Zhang et al., 2018]. Більше того, зараз з'ясовується, що деякі антибіотики, зокрема рапаміцин (сиролімум), є безпосередніми і специфічними активаторами лізосомальних TRP каналів, таких як TRPML1 [Zhang et al., 2019].

Крім їх ролі в кальцієвій сигналізації значна увага дослідників до TRP каналів пояснюється і тим, що різні типи цих каналів виконують ключові сенсорні функції на рівні клітин, оскільки вони активуються найрізноманітнішими факторами фізичної та хімічної природи. Деякі з них (так звані термо-TRP канали) реагують специфічним чином на зміни температури або механічні подразники, наприклад розтягнення мембрани за гіпоосмотичних умов середовища, інші ж є специфічними детекторами змін рН, оксидативного стресу, ліпідного оточення, а також регулюються нейротрансмітерами і гормонами [Clapham et al., 2005; Venkatachalam & Montell, 2007]. Безумовно, всі ці фактори навколишнього середовища відіграють дуже важливу роль у регуляції моторної, секреторної і бар'єрної функцій шлунково-кишкового тракту як у нормі, так і при

розвитку патологій. Зазначимо, що ця роль не обмежується експресією цих каналів у сенсорних нейронах ентєральної нервової системи, що є ключовим «диригентом» цих функцій. Останнім часом накопичуються дані про те, що різні типи TRP представлені також і в незбудливих клітинах – епітеліальних, ендотеліальних і секреторних. Так, наприклад, у наших дослідженнях було з'ясовано, що класичний нейрональний рецептор тепла і капсаїцину TRPV1 у пацієнтів із тяжкою (рефрактерною) формою бронхіальної астми надмірно експресується в епітелії дихальних шляхів [McGarvey et al., 2014; Zholos et al., 2014; Zholos, 2015]. Ймовірно, що порушення саме на рівні TRP-опосередкованої первинної ланки клітинної сигналізації може бути першопричиною поширених захворювань.

В організмі ссавців суперродина TRP каналів представлена на 28 типами подібних за структурою білків, які мають певну гомологію з першим ідентифікованим dTRP каналом дрозофіли. На відміну від інших типів іонних каналів, певної класифікації на основі селективності, механізмів активації, біофізичних або фармакологічних властивостей цих білків не існує, адже вони варіюють у дуже широких межах. Це дещо утруднює класифікацію TRP каналів, але водночас надає їм унікально широкий спектр можливостей для залучення до регуляції багатьох різних функцій, адже сам характер полімодальної, синергічної активації TRP каналів лежить в основі їхньої ролі в інтегративній функції, тобто в здатності клітин комплексним чином детектувати і реагувати на зміни навколклітинного середовища. Ці полімодальні сенсорні і рецептор-активовані катіонні канали, як вже зазначалось, формують первинну ланку детекції різноманітних фізичних і хімічних стимулів. Крім того, TRP канали функціонують не ізольовано. Через їх здатність впливати на рівень мембранного потенціалу і концентрацію внутрішньоклітинного кальцію вони зараз розглядаються в якості тригерних компонентів складних сигнальних мереж, які, зокрема, включають інші, більш «класичні» потенціал- та кальцій-залежні канали, такі як L-типу кальцієві канали та BK калієві канали.

Зараз надійно встановлено, що всі без винятку типи клітин експресують принаймні один тип TRP. Ці білки формують як гомо-, так і гетеротетрамерні комплекси, всередині яких знаходиться селективна для катіонів пора. На основі гомології амінокислотних послідовностей TRP канали ссавців поділяють на 6 родин: канонічні (TRPC; TRPC1–7), ванілоїдні (TRPV; TRPV1–6), анкіринові (TRPA; TRPA1), меластатинові (TRPM; TRPM1–8), муколіпінові (TRPML; TRPML1–3) та поліцистинові (TRPP; TRPP2, TRPP3, TRPP5) [Pedersen et al., 2005; Clapham et al., 2005; Owsianik et al., 2006; Venkatachalam & Montell, 2007; Samanta et al., 2018] (рис. 4.1).

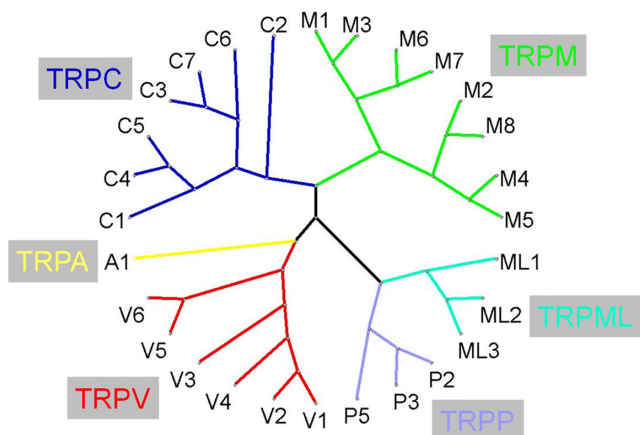


Рис. 4.1. Філогенетичне дерево 28 типів TRP каналів ссавців. Амінокислотні послідовності TRP людини, за винятком TRPC2 (псевдоген у людини, отже була використана амінокислотна послідовність миші), були отримані з бази даних UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Множинне вирівнювання послідовностей було виконано за допомогою програми ClustalX2, а графічне представлення – за допомогою програми Dendroscope3.

За останні 10–15 років більшість з них було ідентифіковано в шлунково-кишковому тракті людини, де ці канали виконують різні регуляторні та модуляторні ролі. Зокрема це стосується таких ключових функцій як моторика, секреція,

бар'єрна функція, механочутливість, больові реакції. Порушення експресії або функції, у тому числі в результаті мутацій в TRP генах (так звані каналопатії), пов'язані з широким спектром розладів гладком'язової тканини та епітелію кишечника, у тому числі це запальні захворювання кишечника, синдром подразненого кишечника, фіброз, вісцеральна гіпералгезія, а також канцерогенез [Nilius et al., 2005; Nilius & Voets, 2005; Holzer, 2010; Boesmans et al., 2011; Nishida et al., 2015; Alaimo & Rubert, 2019; Aroke et al., 2020; Qin et al., 2020]. Шлунково-кишковий тракт – це і джерело багатьох різних факторів та ендогенних активаторів різних типів TRP каналів, і це мішень для дії тих самих факторів на TRP канали, що експресовані в різних типах клітин шлунково-кишкового тракту. Ці фактори включають гормони, нейротрансмітери, похідні арахідонової кислоти, простагландини, протони, механічні стимули, а також продукти метаболізму бактерій і медіатори запалення.

Цікаво, що останнім часом навіть дія інгредієнтів гострої їжі та приправ стала більш зрозумілою завдяки визначенню їхніх специфічних молекулярних мішеней, серед яких основними виявилися різні типи TRP каналів: наприклад для капсаїцину це TRPV1, для ментолу – TRPA1 і TRPM8, для карвакролу/тимолу – TRPV3, TRPA1, TRPC1, C3 і C6, для коричневого альдегіду – TRPA1, для імбиру – TRPC5 і TRPA1, для гірчичної олії – TRPA1, для ваніліну – TRPV3, для евгенолу (основний компонент часникової олії) – TRPV1, TRPV3, TRPM8 [Voets et al., 2005; Vennekens et al., 2008; Vetter & Lewis, 2011]. Це саме стосується і смакової рецепції, і навіть до недавнього часу загадковий молекулярний механізм відчуття жирного смаку (umami – смак 1-аміно кислот) знайшов своє пояснення на шляху пошуку природних лігандів TRP каналів [Ishimaru & Matsunami, 2009; Roper, 2014].

Розглянемо участь деяких найкраще охарактеризованих підтипів TRP каналів у регуляції функції шлунково-кишкового тракту та її порушення в результаті побічної дії антибіотиків.

TRPC4

Одним з найбільш досліджених не тільки в шлунково-кишковому тракті, а й серед усієї суперродини TRP каналів, є рецеп-

тор-керований TRPC4 – представник родини канонічних каналів. TRPC4 експресований як у м'єнтеральних нейронах [Liu et al., 2008], так і в інтерстиціальних клітинах Кахаля [Walker et al., 2002; Kim et al., 2006; Holzer, 2010] та гладком'язових клітинах [Otsuguro et al., 2008; Tsvilovsky et al., 2009]. Нашими дослідженнями було встановлено, що основний медіатор парасимпатичної системи ацетилхолін, який за фізіологічних умов вивільняється з нервових закінчень ентеральних моторних нейронів, шляхом активації M2 та M3 ацетилхолінових рецепторів гладком'язових клітин тонкої кишки спричиняє синергічну активацію TRPC4 каналів [Bolton & Zholos, 1997; Zholos & Bolton, 1997] (рис. 4.2).

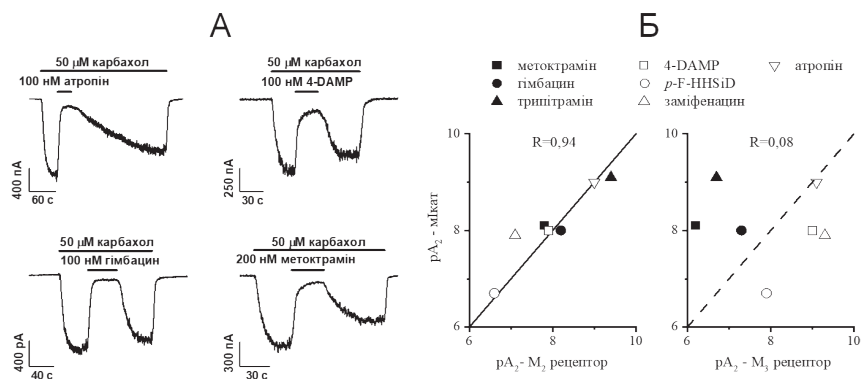


Рис. 4.2. Дія антагоністів мускаринових холіноцєпторів на опосередкований активацією TRPC4 каналів мускариновий катіонний струм (мккат) в ізолюваних гладком'язових клітинах тонкої кишки морської свинки: А – вискоафінний невибірковий антагоніст атропін, M3-селективний антагоніст 4-DAMP та M2-селективні антагоністи гімбацін і метоктрамін значно пригнічують мккат; Б – кореляційний аналіз залежностей між величинами rA_2 , визначених за допомогою аналізу Шілда для мккат та стандартними величинами rA_2 для ряду антагоністів мускаринових рецепторів показує тісну кореляцію у випадку M2 рецептора, що свідчить про його ключову роль у активації мккат. Антагоністи M3 рецепторів інгібують мккат непрямим чином, адже цей рецептор відіграє дозвільну роль [Zholos & Bolton, 1997; Zholos et al., 2004a].

Струм, що при цьому активується, називають мускариновим катіонним струмом (мІкат). Вхідний мІкат викликає деполаризацію мембрани, що, в свою чергу, веде до відкриття потенціалозалежних кальцієвих каналів L-типу, а вхід кальцію в клітину, разом із паралельним вивільненням кальцію із внутрішньоклітинних депо (M3/G_{q/11}/PLC ефект), активує скорочення міоцитів (рис. 4.3).

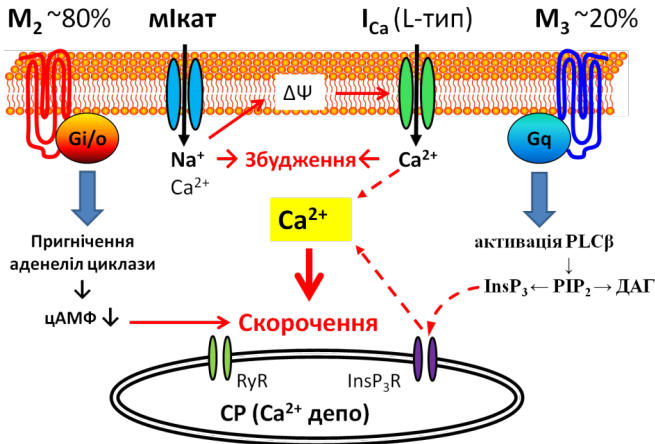


Рис. 4.3. Основні сигнальні шляхи, що лежать в основі холінергічного збудження і скорочення міоцитів кишечника [Bolton et al., 1999; Zholos, 2006].

TRPC4 також є потенціалозалежним каналом, і деполаризація мембрани спричиняє його додаткову активацію. Ця потенціалозалежність додатково контролюється активованими G-білками [Zholos & Bolton, 1994]. Крім того, M3/G_{q/11}/PLC система шляхом гідролізу PIP₂, що в нестимульованих клітинах утримує TRPC4 у закритому стані, виконує свого роду «дозвільну» функцію в його активації [Zholos et al., 2004b; Otsuguro et al., 2008], тоді як збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію значно потенціює мІкат [Gordienko et al., 1999; Gordienko & Zholos, 2004]. Таким чином, активація TRPC4 у гладком'язових клітинах кишечника відбувається без-

посередньо шляхом активації спряжених з M2 рецепторами Gi/o білків [Yan et al., 2003; Jeon et al., 2008], але в той же час цей канал зазнає значних регуляторних впливів з боку M3 рецепторів, як через активацію фосфоліпази C (PLC), так і шляхом мобілізації кальцію з внутрішньоклітинних кальцієвих депо [Gordienko & Zholos, 2004; Zholos et al., 2004b; Otsuguro et al., 2008; Jeon et al., 2020]. Отже, TRPC4 – це центральний компонент складної мережі внутрішньоклітинної сигналізації, як схематично показано на рисунку 4.3, що спричиняє холінергічне збудження і скорочення міоцитів кишечника [Bolton et al., 1999; Jeon et al., 2020]. Інші дослідники продемонстрували важливу роль TRPC4, що експресований в інтерстиціальних клітинах Кахаля, в генерації спонтанної (так званої «пейсмейкерної») електричної активності і, таким чином, спонтанних скорочень кишечника, а також в опосередкуванні ацетилхолін-індукованого збудження гладком'язових клітин кишечника [Torihashi et al., 2002; Walker et al., 2002; Kim et al., 2006; Holzer, 2010].

Зважаючи на таку важливу роль TRPC4 у різних типах клітин кишечника, низка досліджень продемонстрували залучення цього рецептор-керованого іонного каналу в патогенез різних порушень та захворювань. Ми нещодавно показали, що загальні анестетики, такі як інгаляційний анестетик ізофлуран і неінгаляційний анестетик кетамін, значно пригнічують амплітуду мІкат у міоцитах кишечника миші [Dryn et al., 2018; Melnyk et al., 2020]. Було показано, що при запаленні кишечника, що виникає у пацієнтів із хворобою Крона, відбувається значне посилення експресії TRPC4 у слизовій оболонці кишечника [Hong et al., 2017].

TRPA1

TRPA1 є одним з найяскравіших прикладів полімодальної активації, адже цей канал є специфічним рецептором не тільки холоду, а й хімічних стимулів найрізноманітнішої природи [Iwata et al., 2020]. З багатьма з них ми зустрічаємося у повсякденному житті – це хімічні подразники, що викликають алергію, запалення і больові реакції. TRPA1 зараз позиціонується

як важлива молекулярна мішень для протизапальної і знеболювальної терапії [Meents et al., 2019]. TRPA1 експресований переважно в клітинах, які контролюють моторику шлунково-кишкового тракту, а саме в нейронах ентєральної нервової системи і ентєрохромафінних клітинах [Poole et al., 2015]. Алї ізотїоціанат, селективний агонїст TRPA1, стимулює моторику кишечника навїть пїсля відокремлення м'язового шару від слизової оболонки. В якостї найвїрогїднїшого механїзму була запропонована активація вивільнення ацетилхолїну з нервових закінчень ентєральних нейронів, які експресують цей канал [Sandor et al., 2016]. Деякі агонїсти TRPA1 вїдомї як прокїнетики, які можуть ефективно протїдїяти запорам, але специфїчна роль TRPA1 каналів у їх дїї потребує подальших дослїджень. Потрїбно враховувати, що бїльшїсть агонїстів і антагонїстів не тїльки TRPA1, а й інших TRP каналів не мають абсолютної специфїчностї. У товстїй кишцї алї ізотїоціанат проявляє антизапальну і знеболювальну дїї, але знову таки специфїчна роль TRPA1 ще не була пїдтверджена. Потрїбно також враховувати, що є данї (хоча вони залишаються досить суперечливими) про те, що активація TRPA1 (наприклад гїрчичною олією) може спричиняти експериментальний колїт, а експресїя TRPA1 при колїтї також збїльшується.

TRPV1

Бїльшїсть дослїдників сходиться на думцї, що рецептор тепла і капсаїцину присутнїй переважно у первинних сенсорних нейронах спинного мозку або блукаючого нерва [Poole et al., 2015]. Цїкаво, що дїя капсаїцину на моторику кишечника опосередкована вивільненням субстанцїї Р. У товстїй кишцї людини капсаїцин аналогїчним чином стимулює також і секрецїю. Капсаїцин може також пригнїчувати скоротливу функцїю кишечника шляхом ініцацїї вивільнення оксиду азоту, CGRP і серотонїну. Показано, що TRPV1 вїдїграє важливу роль у розвитку колїту. Генетичний нокаут, фармакологїчна блокада або десенситизацїя TRPV1 на фонї дїї капсаїцину посилюють ранню, гостру фазу колїту. Пригнїчення як TRPV1, так і TRPA1 також запобїгають розвитку хронїчного колїту. Пїдкреслимо,

що серед усіх підтипів TRP каналів найповніше з'ясована роль саме TRPV1 у розвитку синдрому подразненого кишечника [Poole et al., 2015]. Ключову роль при цьому відіграє, очевидно, не стільки зміна експресії, як унікальна здатність TRPV1 до формування гіперчутливого стану, що відбувається шляхом фосфорилування білка каналу за участі протеїнкінази С. Цей сценарій подібний до набагато краще дослідженого феномену розвитку нейропатичного болю, при якому TRPV1 також відіграє ключову роль, яка полягає в тому, що сенситизований TRPV1 починає реагувати на стимули, які за нормальних умов були б підпороговими [Srinivasan et al., 2008; Malek et al., 2015; Wang et al., 2015; Koda et al., 2016].

У загальному контексті цієї монографії варто згадати про нещодавнє дослідження, в якому за допомогою високопродуктивного секвенування 16S рРНК було проведено комплексне порівняння відмінностей у мікробіоті між двома групами мишей, одна з яких отримувала капсаїцин через зонд. Миші двох груп продемонстрували суттєві різниці у вазі тіла, кількості лейкоцитів, вмісті води у фекаліях та співвідношенні бактерій кишечника, зокрема таких як *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Roseburia*, *Helicobacter* та *Bacteroides*. При цьому найбільші зміни відбувались у численності *Faecalibacterium*. Шляхом кореляційного аналізу був показаний тісний зв'язок між кількістю бактерій та фізіологічними показниками [Wang et al., 2020].

Інтригуючим питанням для подальших досліджень залишається природа зв'язку між активацією TRPV1 у стінці кишки (ймовірно в закінченнях сенсорних нейронів) і статусом мікробіоти кишечника. З огляду на це зазначимо, що м'ятна олія, один з селективних активаторів TRPM8, полегшує симптоми синдрому подразненого кишечника і має спазмолітичну дію, що було підтверджено декількома клінічними дослідженнями [Poole et al., 2015]. Ментол значно пригнічує скорочення гладком'язових смужок кишечника *in vitro*, і очевидно, що дослідження експресії та функції TRPM8 у різних типах клітин, які знаходяться у стінці кишки, заслуговує на увагу дослідників.

TRPV2

TRPV2 експресований переважно в нейронах ентеральної нервової системи. Активація цього каналу полегшує транзит вмісту кишки. Цей канал є як термо-, так і механосенсорним, і тому, ймовірно, в основі його фізіологічної ролі лежить саме механо-, а не теплова чутливість. TRPV2 відіграє важливу роль в регуляції міогенного тонуусу судин, і хоча ми показали це для артеріол сітківки ока, не виключено, що TRPV2 має таке ж значення і для мікроциркуляції в кишечнику [McGahan et al., 2016].

TRPV3

TRPV3 переважно експресований в епітеліальних клітинах кишечника. Агоністи цього каналу стимулюють вивільнення серотоніну ентерохромафінними клітинами, що може мати важливі наслідки для секреції і скорочень товстої кишки.

TRPV4

TRPV4 активується великою кількістю природних та штучно синтезованих молекул, цей канал є чутливим до підвищення температури, змін рН і механічних стимулів. Крім того, TRPV4 шляхом білок-білкових взаємодій регулює цілий спектр біологічних функцій, це справжній «молекулярний диригент» внутрішньоклітинної сигналізації [White et al., 2016]. До недавнього часу вважали, що TRPV4 експресований переважно у аферентних нервових волокнах і епітеліальних клітинах кишечника. У недавньому дослідженні ми показали, що селективне фармакологічне блокування TRPV4 або «кондиційний» нокаут *trpv4* у макрофагах пригнічували перистальтику кишечника, а також гіперактивність шлунково-кишкового тракту при хіміотерапії. Сигнальний шлях полягає у тому, що активація TRPV4 спричиняє вивільнення макрофагами простагландину E2, що активує скорочення товстої кишки паракринним чином через простагландинові рецептори гладеньком'язових клітин, без участі ентеральної нервової системи [Luo et al., 2018].

Дисфункція TRPV4 каналів лежить в основі порушення епітеліального бар'єра кишечника при хронічних запальних

захворюваннях, зокрема виразковому коліті, подібно до ролі цього каналу у кератиноцитах шкіри [Sokabe et al., 2010]. Крім того, у патогенезі виразкового коліту важливим є також порушення щільності ендотелію судин, що збільшує їх проникність. Індукований декстраном сульфату натрію (DSS) коліт значно ослаблюється в TRPV4-нокаутованих мишей, порівняно з мишами дикого типу, тоді як повторне внутрішньоректальне введення селективного агоніста TRPV4 – GSK1016790A посилює тяжкість DSS-індукованого коліту [Matsumoto et al., 2018].

Таким чином, на сьогодні TRPV4 визначено як одну з найперспективніших мішеней для лікування запальних захворювань кишечника.

TRPM8

TRPM8 відомий насамперед як рецептор холоду і ментолу. Тим не менш, нашими дослідженнями була встановлена його експресія і подвійна функція (активація як скорочення, так і розслаблення) в гладеньких м'язах судин [Johnson et al., 2009; Zholos et al., 2011; Melanaphy et al., 2016]. Дані щодо експресії цього рецептора холоду в клітинах кишечника залишаються досить протирічними, хоча цей канал, як і TRPA1, є чутливим до різних хімічних сполук цікавих з точки зору гастроентерології [Bödding et al., 2007].

4.1. Прозапальні фактори і TRP канали

Прозапальні молекули, такі як простагландини, брадикінін, АТФ, як вже зазначалось, насамперед спричиняють сенситизацію TRPV1. У біоптатах пацієнтів з хворобою Крона та виразковим колітом було виявлено посилення активності TRPV1 у ноцицептивних сенсорних нейронах. TRPV4 також відіграє прозапальну роль у шлунково-кишковому тракті [Alaimo & Rubert, 2019]. При хворобі Крона і, у ще більшій мірі, при виразковому коліті, посилюється експресія TRPV4 у кишечнику, що спричиняє вісцеральний біль [Cenac et al., 2008]. TRPV4 також активує синтез і вивільнення IL-8 клітинами слизової обо-

лонки [Ueda et al., 2011]. Подібно до TRPV1, активація TRPA1 у сенсорних нейронах також спричиняє секрецію нейропептидів, запалення і гіпералгію [Kondo et al., 2009]. При цьому слід зазначити, що інші дослідження, навпаки, пропонують захисну роль як для TRPA1, так і для TRPM8 у процесах запалення кишечника. У випадку TRPM8 це пов'язано з пригніченням вивільнення нейропептидів та прозапальних цитокінів у товстому кишечнику, як було показано на DDS-індукованій моделі коліту у мишей при дії ісіліну – потужного синтетичного активатора TRPM8 [Ramachandran et al., 2013].

4.2. Метаболіти бактеріального походження як регулятори активності TRP каналів

У контексті спричиненого антибіотиками дисбіозу на особливу увагу заслуговує питання, які саме природні регуляторні фактори бактеріального походження при цьому втрачаються, як це може вплинути на функцію шлунково-кишкового тракту і як цьому можна запобігти.

Тіоредоксин бактеріального походження відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті. Підвищення концентрації тіоредоксину відбувається при системному запаленні, наприклад при ревматоїдному артриті. Відомо, що TRPC4 може формувати функціональні гетеротетрамерні комплекси з близьким до нього за будовою TRPC5, тобто серед 4-х субодиниць, що формують пору іонного каналу, можуть бути як TRPC4, так і TRPC5 субодиниці з різною стехіометрією. Останній безпосередньо активується тіоредоксином [Xu et al., 2008]. На моделі індукованого запалення тіоредоксин бактеріального походження (*E. coli*) спричиняв смертність у мишей, яким вводили ліпополісахариди (LPS). Це супроводжувалось зменшенням накопичення лейкоцитів, регулюванням вивільнення цитокінів у черевну порожнину та порушенням опосередкованого макрофагами перитонеального фагоцитозу. Блокада TRPC4/TRPC5 каналів шляхом введення ML204 (розроблений нами селективний блокатор цих каналів [Miller et al., 2011])

спричиняла вищу смертність у мишей з LPS-індуктивним запаленням, яким вводили тiorедоксин [Pereira et al., 2018]. Ці результати свідчать про захисну роль TRPC4/TRPC5 каналів при запаленні, зокрема, опосередкованому бактеріальним тiorедоксином, але з'ясування детальних молекулярних механізмів такого протизапального захисту потребує подальших досліджень. Зазначимо також, що експресований в сенсорних нейронах гангліїв дорсальних корінців TRPC4 був визначений в якості важливої терапевтичної мішені для індукованого гістаміном та серотоніном свербіжжю і запалення шкіри [Lee et al., 2020].

Іншими цікавими з погляду активації TRP каналів метаболітами бактерій є коротколанцюгові жирні кислоти, які, як відомо, відіграють важливу роль у патогенезі синдрому подразненого кишечника. Одним з механізмів дії коротколанцюгових жирних кислот є збільшення експресії гена TRPV6, а це може бути молекулярним механізмом, що бере участь у сприянні всмоктуванню кальцію у кишечнику [Fukushima et al., 2009].

Поліненасичені жирні кислоти є потужними модуляторами активності рецептора холоду і ментолу TRPM8 [Andersson et al., 2007]. TRPA1 раніше був ідентифікований як специфічний сенсор жирних кислот ентерохромафінними клітинами і сенсорними нейронами, на основі чого був зроблений висновок щодо ролі цього каналу в регуляції больової чутливості і функціонування кишечника [Mottet & Ahern, 2012].

Одним із найцікавіших і найактуальніших досліджень останнього часу в цій галузі є робота, в якій був з'ясований молекулярний механізм давно відомого факту, що мікробіота кишечника здатна регулювати енергетичний метаболізм. У цьому дослідженні було показано, що метаболіт лінолевої кислоти КетоА, що продукується молочнокислими бактеріями кишечника, збільшує енергетичні витрати у мишей, що, зрозуміло, запобігає розвитку ожиріння. Методами кальційметрії і петч-клемп електрофізіології було доведено, що КетоА є потужним активатором TRPV1 каналів, а також поси-

лює метаболізм норадреналіну в жировій тканині [Kim et al., 2017].

Варто підкреслити, що у більш широкому контексті більшість, якщо не всі типи TRP каналів, добре досліджені й відомі як сенсори ліпідів, або ж є клітинними мішенями для регуляторних впливів ліпідів [Voets et al., 2005; Beech et al., 2009; Yoo et al., 2014; Taberner et al., 2015; Morales-Lázaro et al., 2017; Riehle et al., 2018]. Тому очевидно, що з часом будуть розкриті нові механізми участі коротколанцюгових жирних кислот у регуляції функцій шлунково-кишкового тракту шляхом їх дії на ті чи інші TRP канали різних типів клітин.

4.3. Роль TRP каналів у формуванні мікробіоти кишечника

Виникає і наступне питання – а чи є зворотний зв'язок, тобто чи впливає якимось чином активність TRP каналів на мікробіоту кишечника? Останні дослідження показують, що такий взаємозв'язок існує [Nagpal et al., 2020]. Ці дані ще раз підтверджують тісну взаємодію «мозок – кишечник», адже ці нові дані стосуються насамперед TRPA1 і TRPV1 каналів, що експресовані в сенсорних нейронах, які іннервують кишечник.

Нокаут генів, що кодують ці термо- і хемочутливі іонні канали, показав чітку різницю у скупченнях мікрофлори кишечника у нокаutowаних мишей порівняно з мишами дикого типу. В TRPA1^{-/-} і TRPV1^{-/-} мишей, а також у мишей з подвійним нокаутом спостерігалось зростання кількості бактерій типу *Bacteroidetes*, що складається з трьох великих класів грамнегативних, анаеробних або аеробних та паличкоподібних бактерій, які значно поширені в навколишньому середовищі, у тому числі в мікробіоті кишечника. Паралельно зменшувалась кількість бактерій типу *Firmicutes* – це тип бактерій, більшість з яких мають грампозитивну структуру клітинної стінки. Ці відмінності головним чином стосувались S24-7, *Bacteroidaceae*, *Clostridiales*, *Prevotellaceae*, *Helicobacteriaceae*, *Rikenellaceae* та *Ruminococcaceae*. В TRPA1^{-/-} мишей зменшувалась

кількість *Prevotella*, *Desulfovibrio*, *Bacteroides*, *Helicobacter* і зростала кількість *Rikenellaceae* та *Tenericutes*. В TRPV1^{-/-} мишей збільшувався вміст *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Desulfovibrio* та *Mucispirillum*. У мишей з подвійним нокаутом зростала кількість *Bacteroidetes*, *Bacteroides* та S24-7 і паралельно зменшувалась кількість *Firmicutes*, *Ruminococcaceae*, *Oscillospira*, *Lactobacillus* та *Sutterella*. Цікаво, що в усіх нокаutowаних мишей збільшувалась кількість бактерій, які синтезують ліпіди і жовчні кислоти, і зменшувалась кількість тих видів бактерій, що синтезують коротколанцюгові жирні кислоти [Nagpal et al., 2020]. Автори цього дослідження вважають, що з таким впливом TRPA1 і TRPV1 каналів на мікробіоту кишечника можуть бути пов'язані насамперед больові реакції (вісцеральний біль) та порушення цілісності епітеліального бар'єра, як це спостерігається при дисбіозі.

4.4. Невирішені проблеми та перспективи

Серед іонних каналів, які зараз визначені як найбільша за численністю група молекулярних мішеней для лікування різних розладів і захворювань, суперродина сенсорних і рецептор-керованих TRP каналів привертає все більшу увагу дослідників з огляду на їх широку експресію в різних типах клітин та важливі функції в детекції хімічних і фізичних стимулів різної природи. Основні типи TRP каналів, що присутні в клітинах стінки кишечника наведені на загальній схемі (рис. 4.4).

Стрімко накопичуються дані щодо ролі TRP каналів у дисбіозі і пов'язаних з ним запальних захворюваннях кишечника та порушеннях епітеліального бар'єра кишечника, але загалом ця галузь досліджень з точки зору терапевтичних застосувань модуляторів TRP каналів все ще перебуває у зародковому стані. Це особливо очевидно, якщо порівняти прогрес стосовно ролі TRP каналів у патогенезі захворювань дихальної системи та хронічного болю, особливо запальної природи, в результаті якого вже були запропоновані конкретні терапевтичні заходи на основі дії модуляторів активності TRP каналів,

деякі з яких вже проходять останні стадії клінічних випробувань [Preti et al., 2012; Zholos et al., 2014; Kaneko & Szallasi, 2014; Zholos, 2015; Marwaha et al., 2016; Huang & Szallasi, 2017; Hung & Tan, 2018; Moran, 2018].

- 1 - гладеньком'язові клітини: **TRPC1/C3/C4/C6, TRPM4**
- 2 - нейрони ентеральної нервової системи: **TRPV1/V2/V4, TRPA1**
- 3 - інтерстиціальні клітини Кахаля: **TRPC1/C2/C4, TRPM7**
- 4 - епітеліальні клітини: **TRPC1, TRPV1/V3/V4/V5/V6, TRPM5/M6/M7, TRPA1**
- 5 - ентерохромафінні клітини: **TRPA1, TRPV1, TRPM5**
- 6 - макрофаги: **TRPV4**

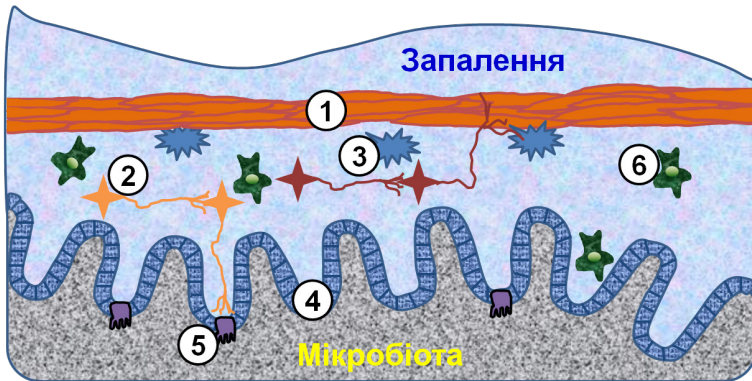


Рис. 4.4. Експресія TRP каналів у кишечнику. В просвіті кишечника знаходяться поживні речовини, метаболіти мікробіоти, різні хімічні речовини (в тому числі й токсичні), які можуть потрапити з їжею, синтезуються клітинами кишечника або бактеріями. Ці хімічні подразники, разом з ендогенними нейромедіаторами, гормонами, цитокінами, медіаторами запалення, є потужними модуляторами активності TRP каналів, які експресуються в різних типах клітин.

Аналіз досліджень ролі TRP каналів у різних типах клітин стінки кишечника, а також врахування того, що значна кількість сполук, які регулярно вживаються як частина дієти, є потужними модуляторами активності тих чи інших типів TRP каналів, дає нам всі підстави вважати, що ця суперродина іонних каналів має значні терапевтичні перспективи. Більшість доклінічних та клінічних досліджень у цій галузі зараз зосереджені на терапевтичному застосуванні фармакологічних

модуляторів TRP каналів для лікування таких порушень як запори, функціональна диспепсія та гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ). Особливо значна увага зараз приділяється TRPA1, TRPV1 та TRPM8.

Водночас залишається багато невирішених питань. Накопичуються дані про суттєві видоспецифічні відмінності у структурі, біофізичних та фармакологічних властивостях TRP каналів. Це, зокрема, стосується і розглянутого нами TRPC4, який є центральним компонентом збудження і скорочення гладком'язових клітин кишечника [Dryn et al., 2016]. Це ставить питання щодо адекватності тих чи інших тваринних моделей патологічних станів для трансляційної медицини.

Дані щодо ролі метаболітів бактеріального походження в регуляції TRP каналів залишаються досить фрагментарними, як і дані стосовно зворотного впливу цих іонних каналів на склад мікробіоти кишечника. Особливо перспективним є дослідження впливу коротколанцюгових жирних кислот на активність тих чи інших типів TRP каналів шлунково-кишкового тракту. Все ще недостатньо існує високоселективних агоністів та антагоністів TRP каналів, що значно ускладнює інтерпретацію експериментальних даних.

Присутність TRP каналів на практично всіх рівнях контролю функцій шлунково-кишкового тракту вказує на важливу роль цих білків у підтриманні гомеостазу. Очевидно, що TRP заслуговують на значну увагу як перспективний клас молекулярних мішеней для фармакологічної корекції порушень та захворювань, і значна кількість публікацій в цій галузі, які з'явилися останнім часом і які ми проаналізували в цьому огляді, свідчать про суттєвий прогрес у досягненні цієї мети.

Список використаних джерел

1. Alaimo A. & Rubert J. The pivotal role of TRP channels in homeostasis and diseases throughout the gastrointestinal tract. *Int J Mol Sci.* 2019. DOI: 10.3390/ijms20215277.

2. Andersson D.A., Nash M. & Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci.* 2007;27: 3347-3355.

3. Aroke E.N., Powell-Roach K.L., Jaime-Lara R.B., Tesfaye M., Roy A., Jackson P. & Joseph P.V. Taste the pain: The role of TRP channels in pain and taste perception. *Int J Mol Sci.* 2020;21: 1-14.

4. Beech D.J., Bahnasi Y.M., Dedman A.M. & AL-Shawaf E. TRPC channel lipid specificity and mechanisms of lipid regulation. *Cell Calcium.* 2009;45: 583-588.

5. Bödding M., Wissenbach U. & Flockerzi V. Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium.* 2007;42: 618-628.

6. Boesmans W., Owsianik G., Tack J., Voets T. & Vanden Berghe P. TRP channels in neurogastroenterology: Opportunities for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 2011;162: 18-37.

7. Bolton T.B., Prestwich S.A., Zholos A.V. & Gordienko D.V. Escitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol.* 1999;61: 85-115.

8. Bolton T.B. & Zholos A.V. (). Activation of M2 muscarinic receptors in guinea-pig ileum opens cationic channels modulated by M3 muscarinic receptors. In *Life Sciences.* 1997: 1121-1128.

9. Cenac N., Altier C., Chapman K., Liedtke W., Zamponi G. & Vergnolle N. Transient Receptor Potential Vanilloid-4 Has a Major Role in Visceral Hypersensitivity Symptoms. *Gastroenterology.* 2008. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.05.024.

10. Clapham D.E., Julius D., Montell C. & Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 427-450.

11. Dong X.P., Wang X. & Xu H. TRP channels of intracellular membranes. *J Neurochem* 2010;113: 313-328.

12. Dryn D., Luo J., Melnyk M., Zholos A. & Hu H. Inhalation anaesthetic isoflurane inhibits the muscarinic cation current and carbachol-induced gastrointestinal smooth muscle contractions. *Eur J Pharmacol.* 2018;820: 39-44.

13. Dryn D.O., Gryshchenko A.V., Bolton T.B., Zhu M.X. & Zholos A.V. Species-Related Differences in the Properties of TRPC4 Channels in Intestinal Myocytes of Rodents. *Neurophysiology*. 2016. DOI: 10.1007/s11062-016-9592-8.

14. Fukushima A., Aizaki Y. & Sakuma K. Short-chain fatty acids induce intestinal transient receptor potential vanilloid type 6 Expression in Rats and Caco-2 Cells 1-3. *J Nutr*. 2009;139: 20-25.

15. Gordienko D.V. & Zholos A.V. Regulation of muscarinic cationic current in myocytes from guinea-pig ileum by intracellular Ca^{2+} release: A central role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 2004;36: 367-386.

16. Gordienko D.V., Zholos A.V. & Bolton T.B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} signalling. *J Microsc*. 1999;196: 305-316.

17. Holzer P. TRP Channels in the Digestive System. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;12: 24-34.

18. Hong S.N., Joung J.G., Bae J.S., Lee C.S., Koo J.S., Park S.J., Im J.P., Kim Y.S., Kim J.W., Park W.Y. & Kim Y.H. RNA-seq Reveals Transcriptomic Differences in Inflamed and Noninflamed Intestinal Mucosa of Crohn's Disease Patients Compared with Normal Mucosa of Healthy Controls. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23: 1098-1108.

19. Huang S & Szallasi A. Transient receptor potential (TRP) channels in drug discovery: Old concepts & new thoughts. *Pharmaceuticals*. 2017. DOI: 10.3390/ph10030064.

20. Hung C.Y. & Tan C.H. (). TRP channels in nociception and pathological pain. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC. 2018;13-27.

21. Ishimaru Y. & Matsunami H. Transient receptor potential (TRP) channels and taste sensation. *J Dent Res*. 2009;88: 212-218.

22. Iwata H., Kanda N., Araki M., Sagae Y., Masuda K. & Okuno Y. Discovery of Natural TRPA1 Activators through Pharmacophore-based Virtual Screening and a Biological Assay. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020;127639.

23. Jeon J., Tian J. Bin & Zhu M.X. TRPC4 as a coincident detector of Gi/o and $Gq/11$ signaling: mechanisms and pathophysiological implications. *Curr Opin Physiol*. 2020;17: 34-41.

24. Jeon J.P., Lee K.P., Park E.J., Sung T.S., Kim B.J., Jeon J.H. & So I. (). The specific activation of TRPC4 by Gi protein subtype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377: 538-543.

25. Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P & Zholos A V. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement

in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009. DOI: 10.1152/ajpheart.01112.2008.

26. Kaneko Y. & Szallasi A. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol.* 2014;171: 2474-2507.

27. Kim B.J., So I. & Kim K.W. The relationship of TRP channels to the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res.* 2006;42: 1-7.

28. Kim M., Furuzono T., Yamakuni K., Li Y., Kim Y.I., Takahashi H., Ohue-Kitano R., Jheng H.F., Takahashi N., Kano Y., Yu R., Kishino S., Ogawa J., Uchida K., Yamazaki J., Tominaga M., Kawada T. & Goto T. 10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. *FASEB J.* 2017;31: 5036-5048.

29. Koda K., Hyakkoku K., Ogawa K., Takasu K., Imai S., Sakurai Y., Fujita M., Ono H., Yamamoto M., Fukuda I., Yamane S., Morita A., Asaki T., Kanemasa T., Sakaguchi G. & Morioka Y. (). Sensitization of TRPV1 by protein kinase C in rats with mono-iodoacetate-induced joint pain. *Osteoarthr Cartil.* 2016;24: 1254-1262.

30. Kondo T., Obata K., Miyoshi K., Sakurai J., Tanaka J., Miwa H. & Noguchi K. Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. *Gut.* 2009;58: 1342-1352.

31. Lee S.H., Tonello R., Choi Y., Jung S.J. & Berta T. Sensory Neuron-Expressed TRPC4 Is a Target for the Relief of Psoriasisiform Itch and Skin Inflammation in Mice. *J Invest Dermatol.* 2020;140: 2221-2229.e6.

32. Liu S., Qu M.H., Ren W., Hu H.Z., Gao N., Wang G. Du, Wang X.Y., Fei G., Zuo F., Xia Y. & Wood J.D. Differential expression of canonical (classical) transient receptor potential channels in guinea pig enteric nervous system. *J Comp Neurol.* 2008;511: 847-862.

33. Luo J., Qian Aю, Oetjen L.K., Yu W., Yang P., Feng J., Xie Z., Liu S., Yin S., Dryn D., Cheng J., Riehl T.E., Zholos A.V., Stenson W.F, Kim B.S. & Hu H. TRPV4 Channel Signaling in Macrophages Promotes Gastrointestinal Motility via Direct Effects on Smooth Muscle Cells. *Immunity.* 2018;49: 107-119.e4.

34. Malek N., Pajak A., Kolosowska N., Kucharczyk M. & Starowicz K. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci.* 2015;65: 1-10.

35. Marwaha L., Bansal Y., Singh R., Saroj P., Bhandari R. & Kuhad A. TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. *Inflammopharmacology* 2016;24: 305-317.

36. Matsumoto K., Yamaba R., Inoue K., Utsumi D., Tsukahara T., Amagase K., Tominaga M. & Kato S. Transient receptor potential vanilloid

4 channel regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *Br J Pharmacol.* 2018;175: 84-99.

37. McGahon M.K., Fernández J.A., Dash D.P., McKee J., Simpson D.A., Zholos A.V., McGeown J.G. & Curtis T.M. TRPV2 channels contribute to stretch-activated cation currents and myogenic constriction in retinal arterioles. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57: 5637-5647.

38. McGarvey L.P., Butler C.A., Stokesberry S., Polley L., McQuaid S., Abdullah H., Ashraf S., McGahon M.K., Curtis T.M., Arron J., Choy D., Warke T.J., Bradding P., Ennis M., Zholos A., Costello R.W. & Heaney L.G. Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133: 704.

39. Meents J.E., Ciotu C.I. & Fischer M.J.M. Trpa1: A molecular view. *J Neurophysiol.* 2019;121: 427-443.

40. Melanaphy D., Johnson C.D., Kustov M.V., Watson C.A., Borysova L., Burdyga T.V. & Zholos A.V. Ion channel mechanisms of rat tail artery contraction-relaxation by menthol involving, respectively, TRPM8 activation and l-type ca^{2+} channel inhibition. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2016;311: H1416-H1430.

41. Melnyk M.I., Dryn D.O., L.T. AK, Dziuba D.O. & A.V. Z. Suppression of mICAT in mouse small intestinal myocytes by general anaesthetic ketamine and its recovery by TRPC4 agonist (-)-englerin A. *Front Pharmacol.* 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.594882.

42. Miller M., Shi J., Zhu Y., Kustov M., Tian J. Bin, Stevens A., Wu M., Xu J., Long S., Yang P., Zholos V.A., Salovich J.M., Weaver C.D., Hopkins C.R., Lindsley C.W., McManus O., Li M. & Zhu M.X. Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *J Biol Chem.* 2011;286: 33436-33446.

43. Morales-Lázaro S.L., Lemus L. & Rosenbaum T. Regulation of thermoTRPs by lipids. *Temperature.* 2017;4: 24-40.

44. Moran M.M. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018;58: 309-330.

45. Motter A.L. & Ahern G.P. TRPA1 Is a Polyunsaturated Fatty Acid Sensor in Mammals ed. Dryer SE. *PLoS One.* 2012;7: e38439.

46. Nagpal R., Mishra S.K., Deep G. & Yadav H. Role of TRP Channels in Shaping the Gut Microbiome. *Pathog (Basel, Switzerland).* 2020;9: 1-16.

47. Nilius B. & Voets T. TRP channels: A TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2005;451: 1-10.

48. Nilius B., Voets T. & Peters J. TRP channels in disease. *Sci STKE*. 2005. DOI: 10.1126/stke.2952005re8.
49. Nishida M., Kuwahara K., Kozai D., Sakaguchi R. & Mori Y. TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets. In *Innovative Medicine*. 2015: 195-218. Springer Japan.
50. Otsuguro K.I., Tang J., Tang Y., Xiao R., Freichel M., Tsvilovskyy V., Ito S., Flockerzi V., Zhu M.X. & Zholos A.V. Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*. 2008;283: 10026-10036.
51. Owsianik G., D'Hoedt D., Voets T. & Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2006;156: 61-90.
52. Pedersen S.F., Owsianik G. & Nilius B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium*. 2005;38: 233-252.
53. Pereira D.M.S., Mendes S.J.F., Alawi K., Thakore P., Aubdool A., Sousa N.C.F., Da Silva J.F.R., Castro J.A., Pereira I.C.P., Silva L.C.N., Grisotto M.A.G., Monteiro-Neto V., Costa S.K.P., Da Costa R., Calixto J.B., Brain S.D. & Fernandes E.S. Transient receptor potential canonical channels 4 and 5 mediate *Escherichia coli*-derived thioredoxin effects in lipopolysaccharide-injected mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018. DOI: 10.1155/2018/4904696.
54. Poole D.P., Lieu T.M., Veldhuis N.A., Rajasekhar P. & Bunnett N.W. Targeting of Transient Receptor Potential Channels in Digestive Disease. In *TRP Channels as Therapeutic Targets: From Basic Science to Clinical Use*. 2015: 385-403. Elsevier Inc.
55. Preti D., Szallasi A. & Patacchini R. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: A patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2012;22: 663–695.
56. Qin F., Lao L., Huang M., Tan H., Jin X., Ma X. & Zeng J. Evaluation of the TRPM protein family as potential biomarkers for various types of human cancer using public database analyses. *Exp Ther Med*. 2020;20: 770-785.
57. Ramachandran R., Hyun E., Zhao L., Lapointe T.K., Chapman K., Hirot C.L., Ghosh S., McKemy D.D., Vergnolle N., Beck P.L., Altier C. & Hollenberg M.D. TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 7476-7481.
58. Riehle M., Tsvetkov D., Gohlke B.O., Preissner R., Harteneck C., Gollasch M. & Nürnberg B. Molecular basis for the sensitivity of TRP channels to polyunsaturated fatty acids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018;391: 833-846.

59. Roper S.D. TRPs in taste and chemesthesis. *Handb Exp Pharmacol*. 2014; 223: 827–871.
60. Samanta A., Hughes T.E.T. & Moiseenkova-Bell V.Y. Transient receptor potential (TRP) channels. In *Subcellular Biochemistry*. 2018: 141-165. Springer New York.
61. Samie M. & Xu H. Studying TRP Channels in Intracellular Membranes. CRC Press/Taylor & Francis. 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593956> [Accessed November 3, 2020].
62. Sandor Z., Dekany A., Kelemen D., Bencsik T., Papp R. & Bartho L. The TRPA1 Activator Allyl Isothiocyanate (AITC) Contracts Human Jejunal Muscle: Pharmacological Analysis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;119: 341-342.
63. Sokabe T., Fukumi-Tominaga T., Yonemura S., Mizuno A. & Tominaga M. The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J Biol Chem*. 2010;285: 18749-18758.
64. Srinivasan R., Wolfe D., Goss J., Watkins S., De Groat W.C., Sculptoreanu A. & Glorioso J.C. Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci*. 2008;28: 1241-1254.
65. Taberner F.J., Fernández-Ballester G., Fernández-Carvajal A. & Ferrer-Montiel A. TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2015;1848: 1818-1827.
66. Torihashi S., Fujimoto T., Trost C. & Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: Requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem*. 2002;277: 19191-19197.
67. Tsvilovskyy V.V., Zholos A.V., Aberle T., Philipp S.E., Dietrich A., Zhu M.X., Birnbaumer L., Freichel M. & Flockerzi V. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in Mice Impairs Smooth Muscle Contraction and Intestinal Motility In Vivo. *Gastroenterology*. 2009;137: 1415–1424.
68. Ueda T., Shikano M., Kamiya T., Joh T. & Ugawa S. The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2011. DOI: 10.1152/ajpgi.00511.2010.
69. Venkatchalam K. & Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem*. 2007;76: 387–417.
70. Vennekens R., Vriens J. & Nilius B. Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6: 79-96.
71. Vetter I. & Lewis R.J. Natural product ligands of TRP channels. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2011: 41–85. Adv Exp Med Biol.

72. Voets T., Talavera K., Owsianik G. & Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol.* 2005;1: 85-92.

73. Walker R.L., Koh S.D., Sergeant G.P., Sanders K.M. & Horowitz B. TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2002. DOI: 10.1152/ajpcell.00266.2002.

74. Wang F., Huang X., Chen Y., Zhang D., Chen D., Chen L. & Lin J. Study on the Effect of Capsaicin on the Intestinal Flora through High-Throughput Sequencing. *ACS Omega.* 2020;5: 1246-1253.

75. Wang S., Joseph J., Ro J.Y. & Chung M.K. Modality-specific mechanisms of protein kinase C-induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site. *Pain.* 2015;156: 931-941.

76. White J.P.M., Cibelli M., Urban L., Nilius B., McGeown J.G. & Nagy I. TRPV4: Molecular conductor of a diverse orchestra. *Physiol Rev.* 2016;96: 911-973.

77. Xu S.Z., Sukumar P., Zeng F., Li J., Jairaman A., English A., Naylor J., Ciurtin C., Majeed Y., Milligan C.J., Bahnasi Y.M., Al-Shawaf E., Porter K.E., Jiang L.H., Emery P., Sivaprasadarao A. & Beech D.J. TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature.* 2008;451: 69-72.

78. Yan H.D., Okamoto H., Unno T., Tsytsyura Y.D., Prestwich S.A., Komori S., Zholos A.V. & Bolton T.B. Effects of G-protein-specific antibodies and G $\beta\gamma$ subunits on the muscarinic receptor-operated cation current in guinea-pig ileal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2003;139: 605-615.

79. Yoo S., Lim J.Y. & Hwang S.W. Sensory TRP channel interactions with endogenous lipids and their biological outcomes. *Molecules.* 2014;19: 4708-4744.

80. Zhang X., Chen W., Gao Q., Yang J., Yan X., Zhao H., Su L., Yang M., Gao C., Yao Y., Inoki K., Li D., Shao R., Wang S., Sahoo N., Kudo F., Eguchi T., Ruan B. & Xu H. Rapamycin directly activates lysosomal mucolipin TRP channels independent of mTOR. *PLoS Biol.* 2019;17: e3000252.

81. Zhang X., Hu M., Yang Y. & Xu H. Organellar TRP channels. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25: 1009–1018.

82. Zholos A. TRP Channels in Respiratory Pathophysiology: the Role of Oxidative, Chemical Irritant and Temperature Stimuli. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13: 279–291.

83. Zholos A., Johnson C., Burdyga T. & Melanaphy D. TRPM channels in the vasculature. In *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2011: 707-729.

84. Zholos A.V. Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/InsP₃/Ca²⁺ system. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27: 833–842.

85. Zholos A.V. & Bolton T.B. Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1997;122: 885-893.

86. Zholos A.V., Bolton T.B., Dresvyannikov A.V., Kustov M.V., Tsvilovskii V.V. & Shuba M.F. Cholinergic excitation of smooth muscles: Multiple signaling pathways linking M2 and M3 muscarinic receptors to cationic channels. *Neurophysiology.* 2004a; 36: 398-406.

87. Zholos A.V., Tsytsyura Y.D., Gordienko D.V., Tsvilovskyy V.V. & Bolton T.B. Phospholipase C, but not InsP₃ or DAG, -dependent activation of the muscarinic receptor-operated cation current in guinea-pig ileal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2004b;141: 23-36.

88. Zholos A.V. & Bolton T.B. G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum. *J Physiol.* 1994;478: 195–202.

89. Zholos A.V., Hanrahan S.R., Stokesberry S.A., Ennis M. & McGarvey L.P. Thermo-TRPs in respiratory health and disease. *Cell Membr Free Radic Res.* 2014;6: 323-324.

Навчальне видання

Толстанова Ганна Миколаївна,
Закордонець Людмила Владиславівна,
Жолос Олександр Вікторович та ін.

Пробіотики на варті порушень роботи кишечника, спричинених застосуванням антибіотиків

Монографія

Підписано до друку 7.12.2020 р.
Формат 60×84/16. Папір друк. № 2. Гарнітура Palatino Linotype.

Умовн. друк. арк. 8,95. Тираж 300 прим.

Видавець Марченко Т. В.
м. Львів-53, 79053, Україна, вул. В. Великого, 51/50, тел. +38 (050) 370-19-57
e-mail: picha1938@ukr.net

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготовлювачів і розповсюджувачів
видавничої продукції: серія ДК № 6784 від 30.05.2019 року,
видане Державним комітетом телебачення і радіомовлення України

Надруковано у друкарні видавця Марченко Т. В.