

І.С.Фоменко, О.П. Корнійчук, А.Р. Гураль, Р.Г. Шикуча, І.І. Ільків, О.Я. Складаров

Роль циклооксигенази у модифікації мікрофлори кишки при стресі

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького;
E-mail: biochemistry@meta.ua

Вивчали зміни NO-синтазної системи та стан макрофлори щурів за умов поєднаної дії водно-імобілізаційного стресу та блокування циклооксигенази. Показано, що на тлі стресу різко зростала активність індукбельної NO-синтази, підвищувалась інтенсивність ліпопероксидації у тонкій та товстій кишці та змінювалась мікрофлора: кількість ешерихій зростала, а ентерококів знижувалась у тонкій кишці та підвищувалась у товстій кишці. Блокування циклооксигенази напроксеном на тлі стресу супроводжувалося зниженням активності індукбельної NO-синтази у тонкій та товстій кишці, порівняно з одночасним активуванням конститутивної NO-синтази в товстій кишці. При цьому було виявлено неістотне зростання числа ентерококів у дванадцятипалій кишці, різке зменшення кількості ешерихій у клубовій кишці, помірне зниження їх у проксимальній частині товстої кишки та зростання у дистальній. Дисбіоз, активація процесів ліпопероксидації та зміни показників NO-синтазної системи за умов поєднаної дії стресу та блокування циклооксигенази можуть створювати передумови для розвитку деструктивних змін, що лежать у основі ентеропатій. Ключові слова: стрес, нестероїдні протизапальні препарати, оксид азоту, мікрофлора, тонка кишка, товста кишка.

ВСТУП

Стрес є одним з ключових чинників, що зумовлює розвиток виразкових ушкоджень органів травної системи, викликаючи зміни моторики, секреції, мікрогемодинаміки, вісцеральної чутливості, проникності мембран клітин. Механізм впливу стресу комплексний, проте його основна складова пов'язана з вивільненням так званих «стрес-гормонів» наднирковими залозами. Останні зумовлюють вазоконстрикцію, і, як наслідок, виникнення гіпоксії та розвиток нітрузо-оксидативного стресу, спричинюють модифікацію вмісту мікрофлори у кишці та індукують зміни рівня нейротрансмітерів і прозапальних цитокінів, що, в свою чергу, також може впливати на кількісний і видовий склад мікрофлори [1]. Зміни секреції та моторики шлунка, дванадцятипалої та товстої кишки викликають активацію факторів, за рахунок яких реалізується

потенціал вірулентності таких бактерій, як *Escherichia coli* та *Campylobacter jejuni* [2].

Іншим чинником, що призводить до розвитку виразкових ушкоджень у травній системі є використання нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Упродовж тривалого періоду основна увага дослідників була приділена гастропатіям, що виникають унаслідок інгібування синтезу простагландинів за умови дії НПЗП. Проте значний ушкоджувальний ефект спостерігається також у тонкій та товстій кишках [3].

У патогенезі НПЗП-індукованої ентеропатії важливу роль відіграють зміни у складі кишкової мікрофлори. Вплив останньої на розвиток виразкових процесів у різних відділах травного тракту має різнонаправлений характер. З одного боку, при підвищенні проникності кишкового бар'єру під дією НПЗП посилюються сенсibiliзуючі

© І.С.Фоменко, О.П. Корнійчук, А.Р. Гураль, Р.Г. Шикуча, І.І. Ільків, О.Я. Складаров

впливи бактерійних симбіонтів (в першу чергу – ліпополісахаридів грамнегативних бактерій), виявляється агресивна дія окремих біологічно активних речовин, які синтезуються мікроорганізмами. Так, доведено концентраційну залежність між активністю глюкуронідази *E. coli*, яка розщеплює кон'югати метаболітів НПЗП до більш токсичних речовин, та інтенсивністю ерозивних процесів слизової оболонки. Також показано, що НПЗП самостійно та опосередковано через вплив на синтез ліпополісахаридів грамнегативних бактерій активують Toll-подібні рецептори. Останні відіграють ключову роль у внутрішньоклітинних механізмах розвитку виказкових ушкоджень у кишці, стимулюючи прозапальні реакції [4]. Тоді як нормосимбіонти виявляють протективну дію на слизову оболонку тонкої кишки, обмежуючи проліферацію умовно-патогенної мікрофлори. Разом з тим при тривалому застосуванні НПЗП у кишкової мікрофлорі не спостерігають таких симбіонтів, як *Bifidobacterium adolescentis* та *Lactobacillus acidophilus* [5].

Як у разі норми, так і патології, система оксиду азоту (NO), що включає субстрат L-аргінін, ферменти NO-синтази (NOS) та безпосередньо продукт NO, відіграє важливу роль у регуляції нормального функціонування органів травної системи. За фізіологічних умов постійно здійснюється експресія ізоформ NOS нейрональної (nNOS) та ендотеліальної (eNOS), які об'єднують під назвою конститутивна NOS (cNOS). NO, що синтезується цими ізоформами бере участь у регуляції фізіологічних процесів: підтримання відповідного рівня кровотоку, процесів транспорту води та електролітів, бактерицидної дії у разі потрапляння мікроорганізмів у слизову оболонку – міжклітинної комунікації, нейротрансмісії у ентеральних нейронах та моторики [6]. При розвитку виразкових ушкоджень, зокрема зумовлених дією НПЗП чи стресових чинників, відзначається різке зростання експресії iNOS та, як наслідок, підвищення продукції NO [7 – 9].

Зміни мікрофлори кишки у зв'язку зі станом системи L-аргінін – NOS – NO у тонкій та товстій кишці за умов поєднання впливу стресу та НПЗП вивчено недостатньо, що і стало метою нашої роботи.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 30 білих щурах масою 180–250 г, згідно з вимогами етики, передбаченими положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Тварини перебували у віварії за відповідних умов освітлення, температурного режиму та стандартного раціону. Перед проведенням досліджень вони мали вільний доступ до води впродовж 20 год.

Тварин було розподілено на 3 групи по 10 у кожній. Інтактні тварини ввійшли до 1-ї контрольної групи, до 2-ї – тварини, яким моделювали водно-імобілізаційний стрес знерухомленням тварин у пластиковому контейнері, із зануренням останнього вертикально у воду ($23 \pm 0,5^\circ\text{C}$) до рівня мечоподібного відростка тварини упродовж 5 год [10]; до 3-ї – яким вводили неселективний блокатор циклооксигенази (ЦОГ) напроксен у дозі 10 мг/кг *per os* за 30 хв до моделювання стресу.

На тлі знеболювання тіопенталом натрію (40 мг/кг) тварин декапітували, розрізали передню черевну стінку по білій лінії живота, виділяли тонку та товсту кишку і промивали її фізіологічним розчином. Для проведення мікробіологічних досліджень відбирали 4 ділянки (дванадцятипалапапа кишка, клубова кишка, проксимальний відрізок товстої кишки та її дистальний відділ). Механічно відділяли слизову оболонку тонкої кишки та товстої кишки і гомогенізували їх для дослідження біохімічних показників.

При проведенні мікробіологічних досліджень використовували класичний культуральний метод [11]. Використовували диференційно-діагностичні та спеціальні живильні середовища. У дванадцятипалій,

клубовій кишці, проксимальному і дистальному відділах товстої кишки виявляли наявність, а також кількість мікроорганізмів: ентерококів, ешерихій, мікроаерофільних бактерій – лактобацил і біфідобактерій; анаеробів клостридіальної групи.

Призначені для посіву фрагменти кишок розрізали, очищали порожнину від залишків вмісту і висівали посів через відбитки на щільній живильній середовища – Ендо та кров'яний агар, що дало змогу виявити досліджувальні мікроорганізми у відповідному відділі травного каналу щура. Для визначення мікробного числа зскрібок зі слизової кишки вносили у пластикові ємності і зважували (близько 1-2 мг), додавали до наважки 1мл стерильного ізотонічного розчину та проводили посів. Після інкубування в термостаті засіяних живильних середовищ при 37 °С впродовж 24 год підраховували кількість пророслих колоній бактерій (колонієутворюючих одиниць – КУО) і перераховували на 1 г матеріалу, отримуючи мікробне число. При дослідженні мікроаерофільної та анаеробної мікрофлори фрагменти кишок (близько 100 мг) розтирали у фарфоровій ступці з 1 мл фізіологічного розчину і після розведення від 1:10 до 1:1000000000 вносили у наступні середовища: для виявлення лактобацил – напіврідкий тіогліколевий агар, для дослідження біфідофлори – Блаурока, для виявлення клостридій – Кітта-Тароці [11]. Приналежність пророслих мікроорганізмів до відповідного таксону встановлювали за морфологічними (мікроскопуванням) і культуральними властивостями. Кількість лактобацил, біфідобактерій та клостридій визначали за найбільшим розведенням первинного матеріалу, при якому в засіяному середовищі спостерігався ріст, перераховували на 1 г матеріалу.

Для оцінки системи L-аргінін – NOS – NO у гомогенатах слизових оболонок тонкої та товстої кишки визначали активність NOS за методом Сумбаєва [12]; вміст нітрит-аніона за допомогою реактиву Грісса [13], актив-

ність аргінази за методом Geyer і Dabich [14]. Процеси ліпопероксидації досліджували за вмістом ТБК-активних продуктів [15].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA “Statistica”. Статистично достовірними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи ентерококи виявлено у всіх досліджених відділах кишки (табл. 1). Їх кількість зростала від $(6,3 \pm 0,21) \times 10^4$ у дванадцятипалій кишці до $(1,6 \pm 0,55) \times 10^5$ КУО/г, у проксимальному відділі товстої кишки, у дистальному відділі вона була дещо меншою – $(7,9 \pm 0,32) \cdot 10^4$ КУО /г, що відповідало даним літератури [16]. Число ешерихій, лактобацил і спороутворюючих анаеробів підвищувалося і було найбільшою у дистальному відділі товстої кишки. Вміст біфідофлори також відрізнявся у відділах тонкої та товстої кишки і коливався від $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^3$ до $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$ КУО/г.

У тварин контрольної групи як у слизовій оболонці тонкої кишки, так і товстої кишки домінувала активність cNOS, що становила $0,58 \pm 0,1$ та $0,49 \pm 0,09$ нмоль/хв·г відповідно, тоді як активність iNOS була незначною. Активність аргінази та вміст нітрит-аніона суттєво не відрізнялися в слизових оболонках тонкої та товстої кишки. Вміст ТБК-активних продуктів не перевищував 240,7 мкмоль/г, що свідчить про низьку інтенсивність процесів ліпопероксидації у тварин контрольної групи (табл.2).

За умов п'ятигодинного стресу були відзначені наступні зміни мікрофлори: кількість ентерококів у тонкій кишці практично не змінювалась, тоді як у дистальній частині товстої кишки відзначали її зростання – від $(7,9 \pm 0,32) \cdot 10^4$ до $(3,2 \pm 0,32) \cdot 10^5$ КУО/г ($P < 0,05$); число ешерихій збільшувалося у клубовій та проксимальній частині, а в дистальній частині воно зменшувалося; кіль-

кісні показники лактобацил у різних відділах кишки за умов стресу суттєво не змінювалися. Кількість біфідобактерій збільшувалась у дванадцятипалій та клубовій кишках, вміст клостридіальної мікрофлори підвищувався у клубовій та зменшувався у дистальному відділі товстої кишки.

Зміни мікрофлори супроводжувалися значними коливаннями показників NO-синтазної системи. Так, стрес спричинював значну активацію iNOS у досліджуваних відділах кишки, зокрема в слизовій оболонці тонкої кишки вона зростала майже втричі, а товстої кишки – приблизно у 5 разів (P<0,01). Водночас знижувалась активність cNOS (на 51 та 65% в слизовій оболонці тонкої та товстої кишок відповідно) та активність аргінази (на 31 та 52% відповідно, P<0,05). Підвищувався вміст

ТБК-активних продуктів на 13-19% (P<0,05), що свідчить про активування процесів ліпопероксидації. Макроскопічно деструктивних змін у слизовій оболонці тонкої та товстої кишок при дії стресу не спостерігалось.

При дослідженні мікрофлори різних відділів кишки тварин, які на тлі стресу отримували блокатор ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксен, відзначили тенденцію до зростання числа ентерококів у тонкій кишці до $(6,3 \pm 0,44) \cdot 10^5$ КУО/г. Кількість ешерихій у клубовій та проксимальній частині товстої кишці зменшилась, а у дистальній частині – збільшилося. Число лактобактерій за вказаних умов зросло в дванадцятипалій кишці (P<0,05), а клостридій – у товстій кишці.

Введення НПЗП на тлі стресу зумовлювало суттєві зміни показників NO-синтазної

Таблиця 1. Розподіл основних груп бактерійних симбіонтів (КУО/г) у різних відділах кишки за умов стресу та інгібування циклооксигенази напроксом (M±m, n=10)

Схема досліджу	Enterococcus spp.	Escherichia coli	Lactobacillus spp	Bifidobacterium spp.	Clostridium spp.
Контроль					
Дванадцятипала кишка	$(6,3 \pm 0,21) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,14) \cdot 10^2$	$(2,5 \pm 0,25) \cdot 10^3$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(5,0 \pm 0,19) \cdot 10^2$
Клубова кишка	$(6,3 \pm 0,25) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,23) \cdot 10^3$	$(2,5 \pm 0,21) \cdot 10^4$	$(6,3 \pm 0,19) \cdot 10^3$	$(6,3 \pm 0,20) \cdot 10^3$
Проксимальний відділ товстої кишки	$(1,6 \pm 0,35) \cdot 10^5$	$(5,0 \pm 0,26) \cdot 10^4$	$(3,2 \pm 0,50) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,27) \cdot 10^4$
Дистальний відділ товстої кишки	$(7,9 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,30) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,35) \cdot 10^8$	$(3,2 \pm 0,40) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$
Стрес					
Дванадцятипала кишка	$(1,0 \pm 0,32) \cdot 10^4$	0	$(1,6 \pm 0,20) \cdot 10^3$	$(1,26 \pm 0,25) \cdot 10^{4*}$	$(6,3 \pm 0,16) \cdot 10^2$
Клубова кишка	$(3,2 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,29) \cdot 10^{4*}$	$3,2 \pm 0,40) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,33) \cdot 10^{5*}$	$(1,0 \pm 0,24) \cdot 10^{4*}$
Проксимальний відділ товстої кишки	$(6,3 \pm 0,30) \cdot 10^5$	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^{5*}$	$(2,5 \pm 0,38) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$(1,3 \pm 0,25) \cdot 10^4$
Дистальний відділ товстої кишки	$(3,16 \pm 0,34) \cdot 10^{5*}$	$(2,0 \pm 0,32) \cdot 10^{4*}$	$(3,2 \pm 0,52) \cdot 10^8$	$(6,3 \pm 0,42) \cdot 10^7$	$(1,6 \pm 0,25) \cdot 10^{4*}$
Стрес і введення напроксену					
Дванадцятипала кишка	$(4,0 \pm 0,33) \cdot 10^4$	0	$(1,0 \pm 0,22) \cdot 10^{4**}$	$(1,6 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,22) \cdot 10^3$
Клубова кишка	$(6,3 \pm 0,32) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,16) \cdot 10^{2\#}$	$(1,0 \pm 0,26) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,32) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,24) \cdot 10^4$
Проксимальний відділ товстої кишки	$(6,3 \pm 0,44) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,35) \cdot 10^{4**}$	$(1,0 \pm 0,35) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,43) \cdot 10^6$	$(1,0 \pm 0,40) \cdot 10^{5**}$
Дистальний відділ товстої кишки	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,40) \cdot 10^{6**}$	$(4,0 \pm 0,40) \cdot 10^8$	$(6,3 \pm 0,32) \cdot 10^7$	$(1,3 \pm 0,33) \cdot 10^{5**}$

*P<0,05, порівняно з інтактними тваринами;

**P < 0,05 порівняно зі значеннями у тварин, які підлягали стресу.

системи. Напроксен спричинював підвищення активності cNOS у слизовій оболонці тонкої та товстої кишок на 12,5 та 43% ($P < 0,05$) відповідно порівняно зі значеннями при стресі. При цьому активність iNOS у слизовій оболонці товстої кишки знижувалась практично вдвічі ($P < 0,05$). Активність аргінази за умов неселективного інгібування ЦОГ на тлі стресу залишалась значно нижчою, ніж у інтактних тварин.

Слід відзначити, що ульцерогенна дія стресу носить комплексний характер – у механізми її розвитку залучені чинники, які регулюють функціонування організму на рівні центральних відділів ЦНС, системи гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз, осі «головний мозок – кишка», а також на клітинному та молекулярному рівнях [1]. Так, вплив стресу викликає порушення мікрогемодинаміки та посилення оксидативних процесів, зростання проникності епітеліального бар'єру, зниження моторики тонкої кишки, а також зміни мікробіоценозу. При цьому моторна функція товстої кишки активується [1, 17].

«Стрес-гормони», з одного боку, викликаючи ішемію слизової оболонки тонкої та товстої кишки, зумовлюють зростання рівня активності iNOS та продукцію NO, а з іншого боку глюкокортикоїди інгібують фосфоліпазу A_2 , що відповідає за вивільнення арахідонової кислоти, та знижують синтез простагландинів [18]. Враховуючи те, що стрес тривав 5 год, більш виражено змінювалась активність системи NOS–NO та процесів ліпопероксидації. Серед досліджуваних мікроорганізмів спостерігали перерозподіл кількості ентерококів та ешерихій у бік їх зростання у тонкій та проксимальному відділі товстої кишки. У дистальному відділі товстої кишки спостерігалась елімінація вказаних груп мікроорганізмів, що можливо пов'язано з активацією рухової активності кишки за умов стресу. Варто зазначити, що згідно з даними літератури стрес зумовлює зменшення кількості лактобактерій в травному тракті [19], проте у наших дослідженнях показано лише тенденцію до її зниження в дванадцятипалій кишці та проксимальному відділі товстої кишки.

Таблиця 2. Зміни активності NO-синтаз (NOS), аргінази, вмісту нітрит-аніону та ТБК-активних продуктів у гомогенатах слизових оболонок тонкої та товстої кишок ($M \pm m$, $n=10$)

Схема досліджу	ТБК-активні продукти, мкмоль/г	Нітрит-аніон, мкмоль/г	NOS, нмоль/хв·г		Аргіназа, мкмоль/хв·мг
			Індуцибельна	Конститутивна	
Контроль					
Тонка кишка	191,0±9,9	17,2±1,3	0,24±0,06	0,58±0,1	0,32±0,04
Товста кишка	240,7±5	17,6±1,3	0,23±0,08	0,49±0,09	0,38±0,08
Стрес					
Тонка кишка	237,0±6,8*	20±0,75*	0,69±0,10*	0,22±0,07*	0,22±0,022
Товста кишка	267,4±6,0	20,5±1,1*	1,1±0,2**	0,17±0,06*	0,18±0,03*
Стрес і введення напроксену					
Тонка кишка	221,0±7,8***	20±0,81	0,39±0,14***	0,32±0,12	0,22±0,03
Товста кишка	277,1±7,3	18,2±1,7	0,54±0,23***	0,30±0,09	0,22±0,04

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з інтактними тваринами; ***- $P < 0,05$ порівняно зі значеннями у тварин, які підлягали стресу.

У наших попередніх дослідженнях також було відзначено, що адреналініндукований стрес призводив до різкого підвищення активності iNOS, та інтенсивності процесів ліпопероксидації при практично відсутніх макроскопічних змінах у слизовій оболонці тонкої та товстої кишки [20]. Подібні зміни спостерігалися за умов водно-імобілізаційного стресу. Порівнюючи ранні зміни активності різних прозапальних ензимів (iNOS, мієлопероксидаза, ЦОГ-2) було показано, що зростання активності та експресії iNOS може служити найчутливішим маркером, котрий відображає ініціацію біохімічних змін, які призводять до розвитку деструктивних ушкоджень [21].

Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі стресу виявило зниження рівня активності iNOS у слизовій оболонці тонкої та товстої кишки у порівнянні зі значеннями при самому стресі. Подібні зміни спостерігалися в слизовій оболонці шлунка [22]. Це зумовлено тим, що між системами ЦОГ – простагландини та NOS–NO існують тісні взаємозв'язки: NO може безпосередньо стимулювати експресію ЦОГ та біосинтез простагландинів через пряму його дію на гем протетичної групи [23]. З іншого боку, простагландини регулюють активність NOS. У зв'язку з цим блокування активності ЦОГ призводить до зниження активності NOS (у першу чергу, iNOS) та продукції NO [8].

Відомо, що при застосуванні таких НПЗП, як диклофенак, напроксен, індометацин тощо відбувається неселективне блокування активності ЦОГ і, як наслідок, суттєве зменшення продукції простагландинів, що за фізіологічних умов здійснюють цитопротекторні ефекти в органах травної системи. Слід відзначити, що селективне інгібування ЦОГ-1 не викликало ушкоджень слизової оболонки, однак призводило до зниження синтезу простагландинів. Ушкоджуюча дія НПЗП у тонкій кишці у разі їх тривалого введення пов'язана з рециркуляцією: після всмоктування НПЗП у тонкій кишці вони надходять у печінку і у

складі жовчі виділяються в дванадцятипалу кишку та викликають деструктивний вплив на епітеліальні клітини [24].

При введенні напроксену на тлі водно-імобілізаційного стресу зміни кількості основних симбіонтів пов'язані з пригніченням утворення NO, який має бактерицидну дію і може відігравати роль селективного фактора в мікробних асоціаціях та зниженням утворення простагландинів, що супроводжується змінами моторики кишки і, відповідно, сповільнює елімінацію окремих груп мікроорганізмів (ешерихій та ентерококів).

З літературних джерел відомо, що введення НПЗП гризунам викликає зміни у кількості та видовому складі кишкових бактерій, що також є одним із факторів розвитку деструктивних ушкоджень кишки. Це в першу чергу стосується суттєвого зростання числа грам-негативних бактерій [24]. Слід відзначити, що деякі мікроорганізми, зокрема лактобацили та біфідобактерії маючи нітрозоредуктазну активність, також беруть участь в утворенні NO [7].

Аналізуючи отримані результати, слід врахувати те, що у раніше проведених нами дослідженнях показано, що блокування ЦОГ на тлі водно-імобілізаційного стресу призводило до зростання деструктивних ушкоджень слизової оболонки шлунка на тлі зниженої активності iNOS [19]. Відсутність макроскопічних ушкоджень слизової оболонки кишки можливо зумовлено вищим її антиоксидантним рівнем захисту порівняно зі слизовою оболонкою шлунка.

Таким чином, блокування ЦОГ на тлі стресу є фактором розвитку дисбіозу, що відбувається одночасно зі змінами нітрово-оксидативного стану кишки щурів. Це може бути спричинено тим, що, інгібітори ЦОГ-1/ЦОГ-2, порушуючи стабільність мутуалістичної системи “організм господаря – мікроорганізм” обмежують позитивні функції нормосимбіонтів, зсуваючи їх активність у бік реалізації патогенних потенцій.

ВИСНОВКИ

1. Водно-імобілізаційний стрес упродовж 5 год викликав різке зростання активності iNOS у слизовій оболонці тонкої та товстої кишок та підвищення рівня ліпопероксидації, тоді як активність cNOS та аргінази знижувалася, що супроводжувалось змінами мікробіоценозу: зростанням кількості ешерихій (крім дванадцятипалої кишки), тенденцією до зниження числа ентерококів у тонкій кишці та їх зростання в дистальному відділі товстої кишки, підвищенням кількості біфідобактерій у дванадцятипалій та клубовій кишці та зниженням вмісту клостридій у дистальному відділі товстої кишки.

2. Блокування ЦОГ напроксеном на тлі стресу у порівнянні зі значеннями у разі самого стресу, призводило до зниження активності iNOS у слизовій оболонці товстої та тонкої кишок, підвищенні активності cNOS в слизовій товстої кишки. При цьому виявлено зниження числа ешерихій у клубовій та проксимальній частині товстої кишки та зростання в дистальній частині товстої кишки. Кількість лактобактерій підвищилась у дванадцятипалій кишці, а клостридій – у тонкій кишці.

3. Незважаючи на короткоривалість впливу стресу та блокування ЦОГ зміни мікробіоценозу в тонкій та товстій кишці та активності iNOS створюють умови для подальшого розвитку ентеропатій.

**И.С.Фоменко, А.П. Корнейчук, А.Р. Гураль,
Р.Г. Шикун, И.И. Ильков, А.Я. Скляр**

РОЛЬ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ В МОДИФИКАЦИИ МИКРОФЛОРЫ КИШКИ ПРИ СТРЕССЕ

Изучали изменения NO-синтазной системы и состояние микрофлоры у крыс в условиях совместного влияния водно-иммобилизационного стресса и блокирования циклооксигеназы. Показано, что стресс сопровождается резким возрастанием активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS), повышением интенсивности процессов липопероксидации в слизистой оболочке тонкой и толстой кишки, а также изменением микрофлоры: количество эшерихий увеличивалось, энтерококков уменьшалось в тонкой и воз-

растало в толстой кишке. Блокирование циклооксигеназы напроксеном на фоне стресса сопровождалось снижением активности iNOS в тонкой и толстой кишках сравнительно со значениями при стрессе, одновременно усиливалась активность конститутивной NOS в толстой кишке. При этом наблюдалось умеренное увеличение количества энтерококков в двенадцатиперстной кишке, резкое уменьшение эшерихий в подвздошной кишке, умеренное снижение содержания последних в проксимальной части толстой кишки, а увеличение – в дистальной ее части. Дисбиоз, активация процессов липопероксидации и изменения показателей системы NOS в условиях совместного действия стресса и блокирования циклооксигеназы могут создавать предпосылки для развития деструктивных изменений, лежащих в основе энтеропатий.

Ключевые слова: стресс; нестероидные противовоспалительные препараты; оксид азота; микрофлора; тонкая кишка; толстая кишка.

**I.S. Fomenko, O.P. Korniyuchuk, A.R. Hural',
R.G. Shykula, I.I. Ilkiv, A.Ya. Sklyarov**

ROLE OF CYCLOOXYGENASE IN MODIFICATION OF INTESTINAL MICROFLORA UNDER STRESS CONDITION

Stress and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, which act as nonselective inhibitors of cyclooxygenase, are the main factors of ulcerogenesis in digestive system. However, the peculiarities of their combined action upon the status of intestinal microflora and the parameters of NO-synthase system are still poorly understood. In experiments with rats we show that water-restrained stress was accompanied by a considerable increase of iNOS activity and intensity of lipoperoxidation processes. The increase of *Escherichia coli* content and the decrease in *Enterococcus spp.* concentration in the small intestine with their simultaneous rise in the large intestine were noticed under these conditions. Cyclooxygenase blockage with naproxen prior to induction of water-restrained stress was accompanied by the decrease of iNOS in small and large intestines, with the synchronous rise of cNOS activity in the large intestine as compared with indexes in stress. The moderate increase in *Enterococcus spp.* content in duodenum with the rise of *Escherichia coli* concentration in the ileum was shown. The *Escherichia coli* content decreased in the proximal part of the large intestine and decreased in its distal part. Disbiosis, intensification of lipoperoxidation processes and changes in NO-synthase system parameters under condition of simultaneous action of stress and cyclooxygenase blockage can create preconditions for the development of destructive changes and enteropathias.

Key words: stress; NSAIDs; nitric oxide; microflora; small intestine; large intestine.

D.Halytskyi National Medical University, Lviv, Ukraine

REFERENCES

1. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol*. 2011. 62(6): 591-599.
2. Collins SM, Bercik P. The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology*. 2009. 136 (6): 2003–2014.
3. Lim YJ, Chun HJ. Recent advances in NSAIDs-induced enteropathy therapeutics: new options, new challenges. *Gastroenterol Resd Pract*. 2013. 2013: 1-7.
4. Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, Nishio H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Takeuchi K, Arakawa T. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut*. 2008. 57 (2): 181-187.
5. Uejima M, Kinouchi T, Kataoka K, Hiraoka I, Ohnishi Y. Role of intestinal bacteria in ileal ulcer formation in rats treated with a nonsteroidal antiinflammatory drug. *Microbiol Immunol*. 1996. 40 (8): 553-560.
6. Vento P, Kiviluoto T, Jarvinen HJ, Soynila S. *Scand J Gastroenterol*. 2001. 36 (2): 180–189.
7. Lundberg JO, Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut*. 2013. 62(4): 616-626.
8. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Res*. 2005. 57 (2): 217–252.
9. Sklyarov AY, Panasyuk NB, Fomenko IS. Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2011. 62 (1): 65-73.
10. Takagi KY, Kayuya Y, Watanabe K. Studies on drugs for peptic ulcer. A reliable method for producing stress ulcers in rats. *Chem Pharm Bull*. 1964. 12: 465-472.
11. Klymnjuk SI, Sytnyk IO, Tvoriko MS, Shyrobokov VP. *Practical microbiology*. Ternopil: Ukrmedknyga; 2004: 438 p.
12. Sumbajev VV, Jasinskaja IM. The influence of DDT on the activity of nitric oxide synthase in liver, lungs and brain of rats. *Modern problems of toxicology*. 2000. 3: 3-7.
13. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982. 126(1): 131-138.
14. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1971. 39(2): 412-417.
15. Timirbulatov RA, Seleznev EI. Method for increasing the intensity of free radical oxidation of lipid-containing components of the blood and its diagnostic significance. *Lab Delo*. 1981. 4: 209-117.
16. Amanov AN. Quantitative relationships of distinct types of gastrointestinal microflora of experimental animals (rats) in norm and under condition of imuran immunosuppression. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1983; 6: 77-81.
17. Larauche M, Kiank C, Tache Y. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *J Physiol Pharmacol*. 2009. 60 (7): 33-46.
18. Basso N, Materia A, Forlini A, Jaffe BM. Prostaglandin generation in the gastric mucosa of rats with stress ulcer. *Surgery*. 1983. 94 (1): 104-108.
19. Galley JD, Bailey MT. Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation. *Gut Microbes*. 2014. 5(3): 390-396.
20. Shamro NR, Panasyuk NB, Fomenko IS, Sklyarov O Ya. Influence of vitamin C on mechanisms of cytoprotection, lipid peroxidation and NO-synthases under stress and experimental colitis in rats. *Biology and medicine Issues Review*. 2011. 3 (86): 159-163.
21. Jorge E, Vergata P, Martin MT. Ileal inducible nitric oxide synthase mRNA expression in response to stress modified in Sprague-Dawley rats exposed to a previous intestinal inflammation. *Stress*. 2012. 15(1): 62-73.
22. Fomenko IS, Bondarchuk TI, Biletska LP, Panasyuk NB, Sklyarov AY. Peculiarities of influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on parameters NO-synthase system in gastric mucosa of rats under stress conditions. *Fiziol Zh*. 2014; 60(2): 51-56.
23. Ling JJ, Sun YJ, Zhu DY, Chen Q, Han X. Potential role of NO in modulation of COX-2 expression and PGE2 production in pancreatic beta-cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 37 (2): 139-146.
24. Wallace JL. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies. *Br J Pharmacol*. 2012. 165 (1): 67-74.

Матеріал надійшов до редакції 17.03.2014.