

Структурні та функціональні особливості слизової оболонки тонкої кишки залежно від кількісного та якісного складу мікробіоти

А.В. Путніков, І.М. Варенюк, Н.М. Рослова, Ю.В. Голота, Т.В. Довбинчук,
Т.М. Червінська, Т.М. Сергійчук, М.Е. Дзержинський, Г.М. Толстанова

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; e-mail: gtolstanova@gmail.com

*Досліджували структурні та функціональні особливості слизової оболонки тонкої кишки на білих лабораторних щурах залежно від мікробіотного складу пристінку протягом 14 діб, аутопсію проводили на 15, 29 та 72-гу добу від початку експерименту у віддалені терміни застосування цефтріаксону або сумісного його введення з мультипробіотиком. Слід відмітити зміни структурного та функціонального стану слизової оболонки тонкої кишки щурів, що супроводжуються гіпертрофією келихоподібних клітин та дегрануляцією тучних клітин. Наслідки зберігаються у віддалені терміни після його відміни, зокрема, на 29-ту та 72-гу добу експерименту. Зміни слизової оболонки тонкої кишки тісно пов'язані з порушенням складу пристінкової мікробіоти, яка характеризувалася ростом умовно-патогенної, зокрема, *Staphylococcus aureus*, грибів роду *Candida*. Схема одночасного використання та відміни мультипробіотика з цефтріаксоном є малоефективною для усунення негативних наслідків введення антибіотика. Антибіотик разом з мультипробіотиком та продовження застосування другого, а також послідовне їх введення відповідно є значно ефективнішими порівняно з першим режимом і дає змогу зменшити або повністю усунути порушення структурного та функціонального стану слизової оболонки тонкої кишки.*

Ключові слова: тонка кишка; антибіотикотерапія; структурний та функціональний стан слизової оболонки; мікробіота; пробіотик.

ВСТУП

Відомо, що антибіотикотерапія, окрім основної дії на патогенну складову мікробіоти організму, може викликати низку побічних ефектів. Окрім токсичного і сенсibilізуючого впливу на організм, що сприяють виникненню суперінфекції та рецидивуючого і хронічного перебігу хвороби, антибіотики впливають на нормобіоту кишечника з розвитком тяжких форм дисбіозу (III-IV ступеня) [1]. Разом з тим антибіотикотерапія є невід'ємною складовою терапії при багатьох інфекційних та неінфекційних патологіях (запальних захворюваннях кишечника).

Порушення захисної функції нормальної мікробіоти, збільшення популяції умовно-па-

тогенних мікроорганізмів сприяє розвитку вторинного імунодефіциту і зниженню ефективності захисного бар'єра стінки кишечника, що полегшує інвазію мікроорганізмів, проникнення бактеріальних токсинів у кровотік, уповільнює виведення збудника з організму, пролонгуючи захворювання на фоні антибіотикотерапії [2]. Відомо, що цілісність кишкового бар'єра відіграє критичну роль у забезпеченні гомеостазу усього організму. Порушення якого пов'язане з розвитком багатьох захворювань, зокрема, алергії кишкової етіології, алергічних астми та дерматиту, запальних захворювань кишечника [3-6]. Часто застосування антибіотиків є передумовою виникнення цих патологій. При цьому профілактичне та терапевтичне

застосування симбіотичних бактерій (лактобацил) до або після хімічно викликаного коліту відновлювало цілісність кишкового бар'єра [7]. Це свідчить про необхідність нормального складу мікробіоти для функціонування епітеліального бар'єра. Раніше нами було показано, що тривале застосування антибіотиків цефалоспоринового ряду III покоління цефтріаксону протягом 14 діб викликало глибокі порушення функціонального стану епітелію товстої кишки, спричиняючи діарею та посилення секреторних процесів у кишечнику [8]. Дослідження негативних наслідків зрушень нормобіотного пейзажу зосереджені, за невеликим виключенням [9-11], на відділах товстої кишки та фекальної мікробіоти. Проте 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, у складі нормобіоти [12].

Метою нашої роботи було дослідження структурних та функціональних особливостей слизової оболонки тонкої кишки щурів (товщина слизової оболонки, висота ворсин, глибина крипт, площа поперечного перерізу келихоподібних клітин та епітеліоцитів, а також, дегрануляція тучних клітин) у віддалені терміни застосування антибіотика і мультипробіотика.

МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 70 білих нелінійних лабораторних щурах-самцях масою 180-230 г. Усіх тварин утримували за стандартних умов віварію на повноцінному раціоні для лабораторних тварин. Експерименти були проведені згідно з етичними принципами, ухваленими Першим національним конгре-

сом України з біоетики, міжнародним угодам та національному законодавству у цій галузі. Було сформовано 14 груп щурів (табл. 1). Контрольній групі один раз на день протягом 14 діб внутрішньом'язово вводили по 0,1 мл дистильованої води. Антибіотик цефтріаксон (Артеріум, ВАТ «Київмедпрепарат», Україна) робили ін'єкції раз на день протягом 14 діб (300 мг/кг) внутрішньом'язово, а мультипробіотик «Симбітер» (SYMBITER® ACIDOPHILUS concentrate, ТОВ фірма „Пролісок”, Україна) перорально раз на добу в дозі $1,6 \cdot 10^9$ КУО. Використаний мультипробіотик містив біомасу живих клітин симбіозу пробіотичних мікроорганізмів, колонієутворюючих одиниць на 1 мл, не менш ніж: лактобацили і лактококи – $1,0 \cdot 10^9$, біфідобактерії – $1,0 \cdot 10^8$, пропіоновокислі бактерії – $3,0 \cdot 10^7$, оцтовокислі бактерії – $1,0 \cdot 10^5$. Під час експерименту використовували три режими комбінованого введення антибіотика і мультипробіотика. До контрольної групи (I, II, III) ввійшли інтактні тварини, яким вводили фізіологічний розчин, до IV, V, VI - антибіотик і мультипробіотик (1-14 діб) та на 15, 29 і 72-гу добу здійснювали аутопсію відповідно. Щурам VII групи вводили антибіотик (1-14 діб) та мультипробіотик на 15-28-му добу, VIII, IX - цефтріаксон (1-14 діб) здійснювали аутопсію на 29 і 72-гу добу відповідно. Щурам X групи вводили антибіотик і мультипробіотик (1-14 діб) та мультипробіотик 15-28-му добу, XI, XII - антибіотик і мультипробіотик (1-14 діб), аутопсія була на 29 і 72-гу добу відповідно.

Аутопсію проводили за допомогою CO₂-інгаляції з наступною цервікальною дислокацією на 15, 29 та 72-гу добу від початку експерименту.

Для гістологічних досліджень було взято відрізок тонкої кишки довжиною 2 см на відстані 3 см від ілеоцекальної заслонки. Було використано 2 методики фіксації зразків: у 10%-му формаліні та розчині Карнуа. Зрізи, які зберігалися у формаліні, забарвлювали гематоксиліном Бемера та еозином. Їх аналізували під мікроскопом для виявлення загаль-

них морфологічних змін та вимірювали такі морфометричні показники: питому площу сполучно-тканинної стромы до епітелію у слизовій оболонці, товщину слизової оболонки, висоту ворсин, глибину крипт, висоту війчастих епітеліоцитів у ворсинах, площу перерізу ядер епітеліоцитів у ворсинах, висоту війчастих епітеліоцитів у криптах, площу перерізу ядер епітеліоцитів у криптах. Зрізи, які були у розчинні Карнуа, забарвлювали альціановим синім з дофарбуванням карміном. На цих зрізах вимірювали площу перерізу слизових келихоподібних клітин окремо у ворсинах і у криптах, а також візуально під мікроскопом оцінювали стан поверхневого слизу. Зрізи тонкої кишки, фіксовані у розчині Карнуа, забарвлювали за допомогою набору для цитохімічної ідентифікації тучних клітин толудіновим синім (ТОВ «БіоВитрум», Росія) згідно з протоколом фірми виробника. В тучних клітинах підраховували кількість гранул на одну клітину під імерсійним об'єктивом мікроскопа. У кожній експериментальній групі було проаналізовано щонайменше 100 клітин.

Кольорові мікрофотографії гістологічних препаратів тонкої кишки для морфометричного аналізу отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 («Olympus Europe GmbH», Японія). Морфометричні показники вимірювали на мікрофотографіях з використанням програмного забезпечення Image J (США).

Для мікробіологічного аналізу збирали ділянку слизової оболонки (1 см²) тонкої кишки на відстані 2 см від ілеоцекальної заслонки. Її тричі промивали від хімусу у фізіологічному розчині, після чого подрібнювали у гомогенізаторі Поттера та робили розведення з 10⁻¹ по 10⁻⁵ у фізіологічному розчині (пристінковий біоптат). Експериментально були адаптовані основні розведення для засіву на відповідні елективно-диференційні середовища («HiMedia Laboratories Pvt.Ltd», Індія). Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними,

тинкторіальними та фізіолого-метаболічними показниками (реакція на плазмокоагуляцію, ДНКазна активність, продукція лізоциму, фосфатази, чутливість до новобіцину - для відокремлення *S. aureus* від *S. saprophyticus*; оксидазний тест, тести на ферментацію вуглеводів, реакція Фогеса-Проскауера, тест на рухливість, утворення сірководню - для відокремлення лактозонегативної *E. coli* від умовно-патогенних ентеробактерій). Результати представлені у вигляді $M \pm m \lg \text{ КУО/см}^2$.

Обробку морфометричних цифрових результатів проводили методами варіаційної статистики. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Уїлка. Підраховували середнє арифметичне та похибку середнього. Достовірність різниці між контрольною та дослідними групами оцінювали за допомогою критерію t Стюдента для незалежних вибірок.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфометричні показники стану слизової оболонки тонкої кишки щурів. На першу добу після відміни антибіотика в тонкій кишці дослідних тварин спостерігалася гіпертрофія війчастих епітеліоцитів, які знаходяться в ворсинках: збільшувалася висота клітин та площа поперечного перерізу ядер (на 26,7 та 16,5% відповідно, $P < 0,05$), висота ентероцитів, розташованих у криптах та площа поперечного перерізу їх ядер не відрізнялися від контролю (табл.1, рис.1). Зменшувалася товщина слизової оболонки, висота ворсин і глибина крипт, що свідчить про зниження функціональної активності.

Секреторний апарат слизової оболонки тонкої кишки не зазнавав змін: площа поперечного перерізу слизових келихоподібних клітин у ворсинах та у криптах достовірно не відрізнялася від контрольної групи (рис.2). Проте спостерігалася дегрануляція тучних клітин (кількість гранул зменшувалася на 38,5%, $P < 0,05$; рис.3).

Таблиця 1. Морфометричні показники тонкого кишечника щурів у віддалені терміни різних режимів введення антибіотика цефтріаксону (300 мг/кг, внутрішньом'язово) та мультипробіотика (160 мг/кг, per os).

Схема досліджу	Товщина слизової оболонки, мкм	Висота ворсин, мкм	Глибина крипт, мкм
15-та доба			
Контроль	541±7	231±4	173±5
Антибіотик	469±6*	183±4*	150±3*
Мультипробіотик	582±7*	211±3*	173±4
Антибіотик і мультипробіотик	470±3*	186±3*	147±3*
29-та доба			
Антибіотик	423±6*	148±4*	168±3
Мультипробіотик	405±7*	176±3*	184±3
Антибіотик і мультипробіотик	336±4*,**	166±2*,**	129±2*,**
Антибіотик → мультипробіотик	559±6*	200±4*,**	202±5*,**
Антибіотик і → мультипробіотик	414±7*	166±4*,**	150±3*,**
72-га доба			
Антибіотик	471±3*	175±3*	140±4*
Мультипробіотик	419±6*	153±2*	169±3
Антибіотик і мультипробіотик	416±4*,**	140±3*,**	159±3*,**
Антибіотик → мультипробіотик	544±3**	215±2*,**	173±4**
Антибіотик і → мультипробіотик	505±6*,**	179±5*	192±4*,**

* P<0,05 порівняно з контролем; ** P<0,05 порівняно з групою, яка отримувала лише цефтріаксон

Після відміни антибіотика (29-та доба експерименту) в стінці тонкої кишки щурів знижувалася функціональна активність епітеліальних клітин слизової оболонки (зменшення висоти ворсин та глибини крипт, товщини слизової оболонки), відбувалася гіпертрофія келихоподібних клітин та накопичення секрету в них (див. рис.2).

На 72-гу добу експерименту атрофія слизової оболонки та гіпертрофія келихоподібних клітин крипт і ворсин послаблювалася (табл.2; див. рис.2). Інтенсивність забарвлення келихоподібних клітин зменшувалася, що свідчить про викид слизу та/або зниження інтенсивності секреторних процесів в слизовій оболонці тонкої кишки. Кількість гранул у тучних клітинах відновлювалася до значень контрольної групи (див. рис.3). Келихоподібні клітини, тип спеціалізованих епітеліоцитів, які відіграють захисну роль у

кишечнику, завдяки продукції біоактивних компонентів, що включають в себе муцини, кишечні фактори (trefoil factors) та інші протимікробні субстанції [13], сприяє цілісності кишкового бар'єра та забезпечує гомеостаз здорової кишки [14]. 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 невеликих речовин з просвіту кишки до дендритних клітин у *lamina propria* [15]. 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 [16]. Можливо, саме утворення GCPs-каналів є шляхом виникнення запален-

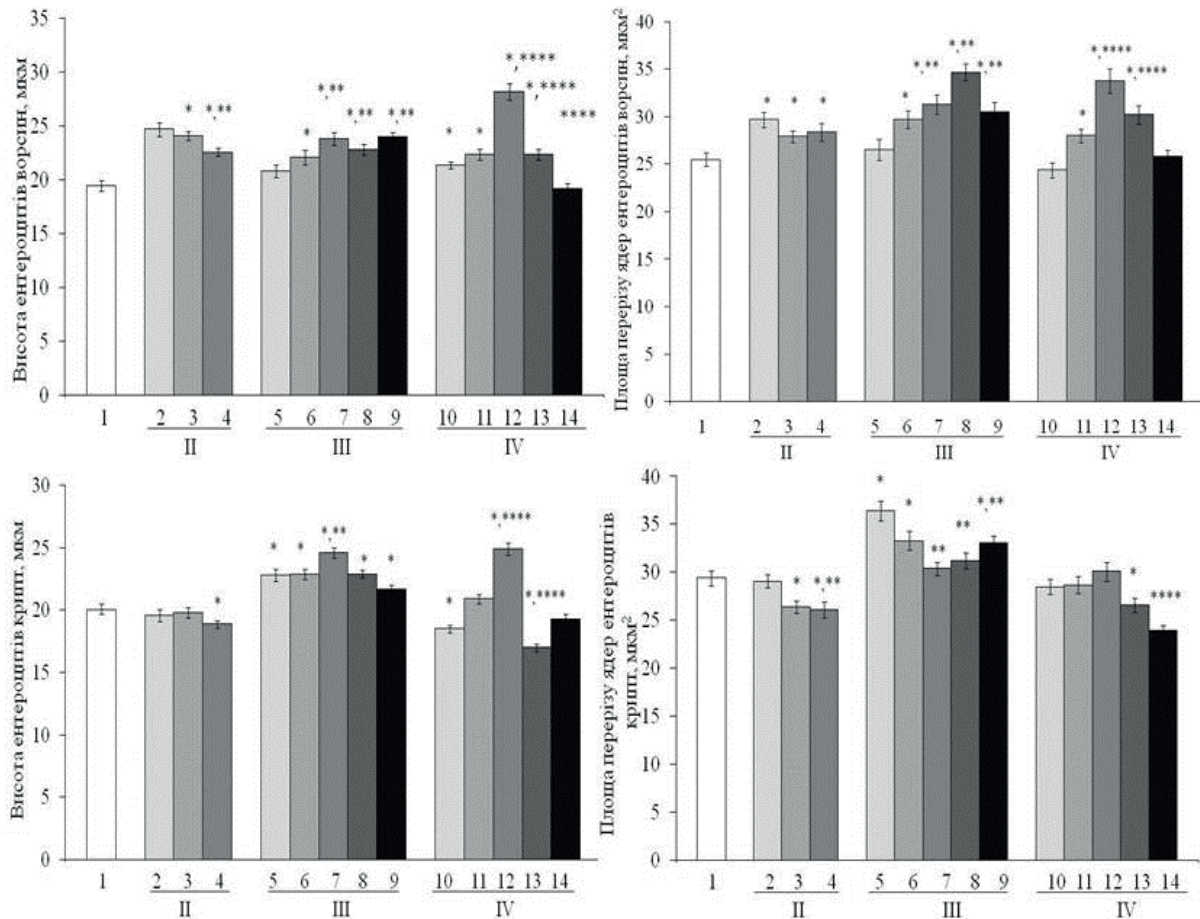


Рис. 1. Морфометричні параметри епітеліальних клітин слизової оболонки тонкої кишки: висота ентероцитів ворсин, крипт та площа перерізу їх ядер на фоні різних режимів застосування цефтріаксону (300 мг/кг, внутрішньом'язово) та мультипробіотика (160 мг/кг, per os), I – контроль; II – аутопсія 15-та доба; III – аутопсія 29-та доба; IV – аутопсія 72-та доба. 2, 3, 4 – цефтріаксон; мультипробіотик; цефтріаксон і мультипробіотик (1-14-та доба); 5, 6, 7 – цефтріаксон; мультипробіотик, цефтріаксон і мультипробіотик, (1-14 доба) відповідно; 8 – цефтріаксон (1-14 діб) і мультипробіотик (15-28-ма доба); 9 – цефтріаксон (1-14 діб) і → мультипробіотик (1-28-ма доба); 10, 11 цефтріаксон; мультипробіотик (1-14-та доба); 12 – цефтріаксон і мультипробіотик (1-14 доба); 13 – цефтріаксон (1-14 діб) і → мультипробіотик, (15-28-ма доба); 14 – цефтріаксон (1-14 доба) і → мультипробіотик (1-28-ма доба).

* $P < 0,05$ порівняно контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 5); *** $P < 0,05$ порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 10)

ня, викликаного застосуванням антибіотика.

Зміни мікробіоти пристінкового біоплату тонкої кишки після застосування антибіотиків. Порушення гомеостазу кишкового бар'єра, зокрема, зміни у секреторній здатності келихоподібних клітин створюють умови для контакту бактерій з епітеліоцитами та подальшого запуску деструктивних змін. Нашими дослідженнями встановлено, що вже в перший день після відміни цефтріаксону,

на два порядки зростала кількість представників роду *Bifidobacterium* і залишалася на такому рівні протягом всього періоду дослідження. Число молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*, яким належить провідна роль у підтриманні рН-гомеостазу, після відміни антибіотика зоставалося на рівні контрольних значень і лише на 72-гу добу зростало на один порядок (табл.2).

Представник апатогенних цукролітичних

бактерій роду *Propionibacterium* збільшувався з $\lg 3,3 \pm 0,1$ до $\lg 5,1 \pm 0,3$ КУО/г одразу після відміни цефтріаксону і не висівався зовсім на 29-ту та 72-гу добу. Відмічалось зростання представників роду *Bacteroides* з $\lg 1,5 \pm 0,2$ до $\lg 6,0 \pm 0,1$ КУО/г після припи-

нення введення цефтріаксону, на 29-ту добу їх кількість знижувалася до $\lg 4,3 \pm 0,3$ КУО/г і на 72-гу добу представники цієї популяції не висівалися зовсім. З одного боку, вони характеризуються деяким функціям, фізіологічними для організму: активно ферментують

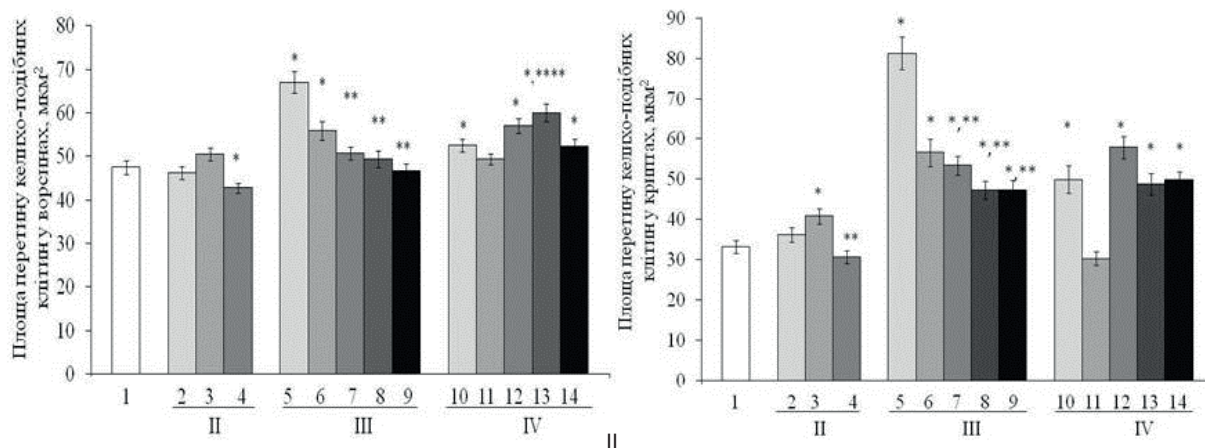
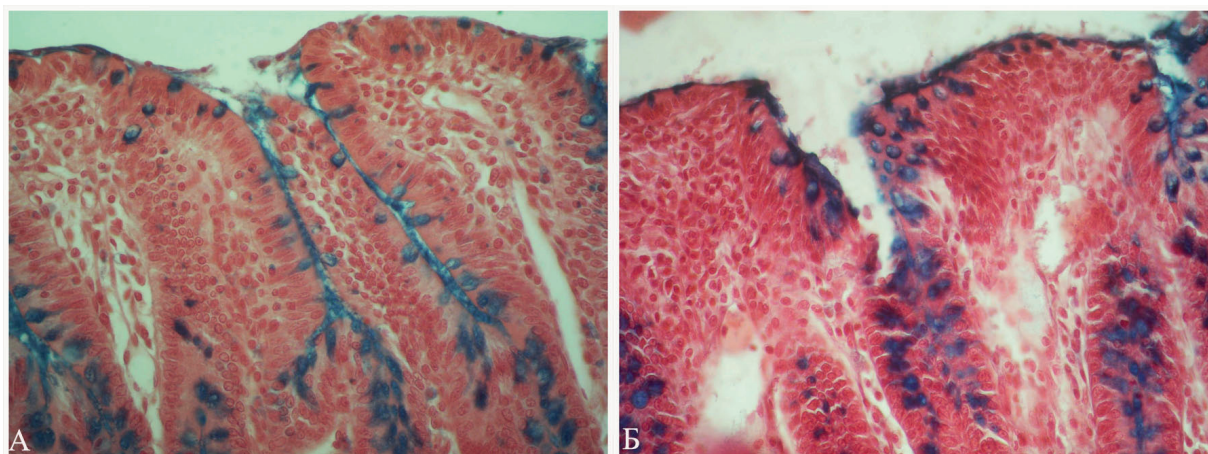


Рис. 2. І. Стан поверхневого слизу та келихоподібних клітин ворсин тонкого кишечника у тварин контрольної групи (А) та після впливу антибіотика цефтріаксону (300 мг/кг, внутрішньом'язово) протягом 14 діб (Б). Забарвлення альціановим синім та галуновим карміном. Збільшення: об. $\times 40$, ок. $\times 10$.

1 – поверхневий шар слизу; 2 – келихоподібні клітини.

II. Морфометричні параметри келихоподібних клітин у ворсинках та криптах слизової оболонки тонкого кишечника на фоні різних режимів застосування антибіотика цефтріаксону (300 мг/кг, внутрішньом'язово) та мультипробіотика (160 мг/кг, per os). I – контроль; II – аутопсія 15-та доба; III – аутопсія 29-та доба; IV – аутопсія 72-та доба.

2, 3, 4 – цефтріаксон; мультипробіотик; цефтріаксон і мультипробіотик (1-14-та доба); 5, 6, 7 – цефтріаксон; мультипробіотик, цефтріаксон і мультипробіотик, (1-14 доба) відповідно; 8 – цефтріаксон (1-14 діб) і мультипробіотик (15-28-ма доба); 9 – цефтріаксон (1-14 діб) і → мультипробіотик (1-28-ма доба); 10, 11 цефтріаксон; мультипробіотик (1-14-та доба); 12 – цефтріаксон і мультипробіотик (1-14 доба); 13 – цефтріаксон (1-14 діб) і → мультипробіотик, (15-28-ма доба); 14 – цефтріаксон (1-14 доба) і → мультипробіотик (1-28-ма доба)

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; * $P < 0,05$ порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 5); *** $P < 0,05$ порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 10).

вуглеводи і пептони з накопиченням широкого спектра коротколанцюгових жирних кислот. З іншого боку, бактероїди відносяться до грамнегативних бактерій і мають цілу низку факторів патогенності, а *Bacteroides fragilis* виробляє ентеротоксин, який стимулює секрецію хлоридів та розщеплює Е-кадгерини щільних контактів епітеліоцитів кишки, стимулюючи їх дегенерацію [17]. Кишкова паличка з нормальними ферментативними властивостями після прийому антибіотика зникає з пристінкового біотопу тонкої кишки, проте у віддалені терміни після антибіотико-

терапії (29 – 72-га доба) з'являються її лактозонегативні форми. Також у досить високій кількості ($\lg 4,0 \pm 0,2$ КУО/г) у пристінковому біопататі тонкої кишки висіваються дріжджеподібні гриби роду *Candida*.

Після завершення курсу прийому антибіотика з'являються бактерії роду *Clostridium spp.*, яких відносять до умовно-патогенних мікроорганізмів, а *Clostridium difficile* вважають одним з факторів розвитку псевдомембранозного коліту. Поява бактерій роду *Clostridium spp.* можна розглядати як компенсаторну реакцію мікробіоти у відповідь на

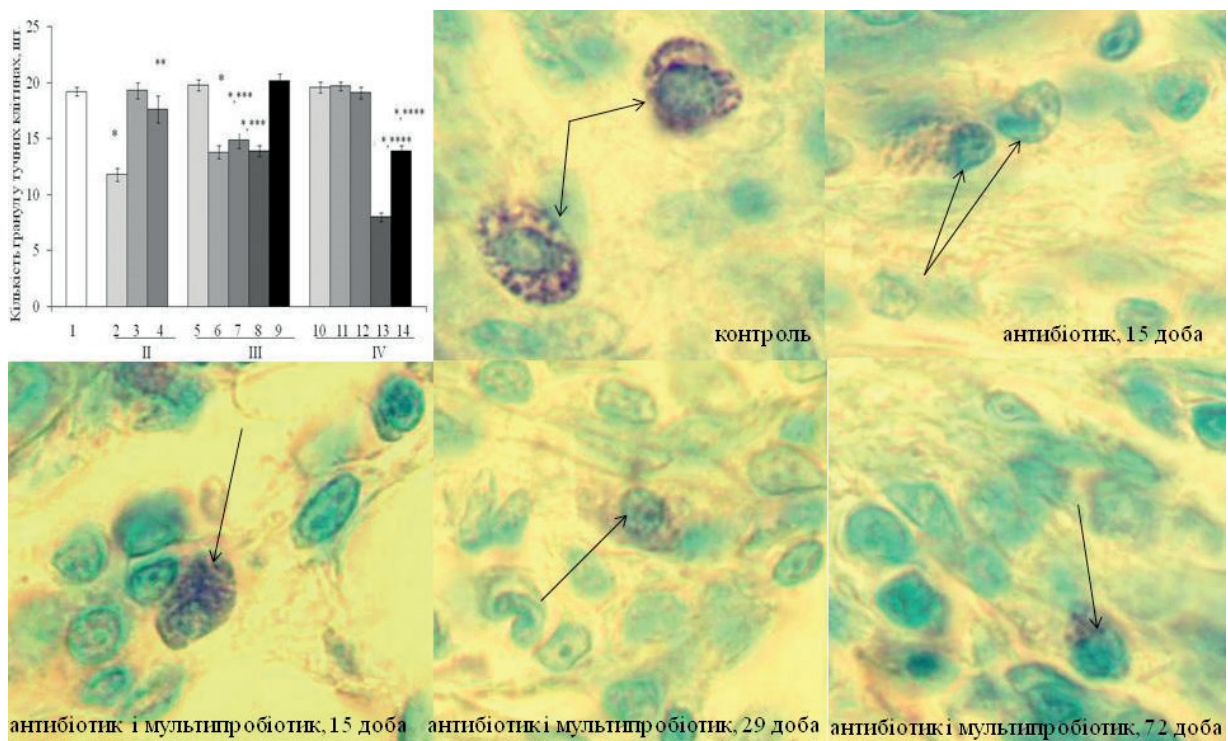


Рис. 3. Стан тучних слизової оболонки тонкого кишечника та кількість гранул у тучних клітинах на фоні різних термінів після застосування антибіотика цефтріаксону (300 мг/кг, внутрішньом'язово) та мультипробіотику. Забарвлення толуїдиновим синім. Збільшення $\times 900$. I – контроль; II – аутопсія 15-та доба; III – аутопсія 29-та доба; IV – аутопсія 72-га доба. 2, 3, 4 – цефтріаксон; мультипробіотик; цефтріаксон і мультипробіотик (1-14-та доба); 5, 6, 7 – цефтріаксон; мультипробіотик, цефтріаксон і мультипробіотик, (1-14 доба) відповідно; 8 – цефтріаксон (1-14 діб) і мультипробіотик (15-28-ма доба); 9 – цефтріаксон (1-14 діб) і мультипробіотик (1-28-ма доба); 10, 11 цефтріаксон; мультипробіотик (1-14-та доба); 12 – цефтріаксон і мультипробіотик (1-14 доба); 13 – цефтріаксон (1-14 діб) і мультипробіотик, (15-28-ма доба); 14 – цефтріаксон (1-14 доба) і мультипробіотик (1-28-ма доба).

* $P < 0,05$ – порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ – порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 2); *** $P < 0,05$ – порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 5); **** $P < 0,05$ порівняно з групою, якій вводили цефтріаксон (група 10). Стрілочками вказані тучні клітини, інтенсивність забарвлення вказує на кількість гранул в тучних клітинах.

пошкодження епітелію, зумовлене введенням антибіотика. Оскільки *Clostridium spp.* продукує бутират, який посилює бар'єрні властивості слизової оболонки через підвищення експресії муцину, антимікробних пептидів та протеїнів щільних контактів [18].

Отже на 29-ту добу експерименту мікробіологічні показники практично такі самі, як і в 1-шу добу після відміни антибіотика. Нормалізації до рівня контрольних значень не відмічали. На 72-гу добу у щурів зміни нормобіоти стають більш вираженими. При повному зникненні з пристінкового біотопу анаеробних представників родів *Propionibacterium* та *Bacteroides* на один-два порядки зростає кількість цукролітичних анаеробів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*. З літературних джерел відомо, що збільшення концентрації облігатно-анаеробних цукролітичних бактерій у тонкій кишці може спонукати до передчасної декон'югації жовчних кислот і втрати їх з калом, утворення гідроокислів жирних і жовчних кислот [19]. В свою чергу надлишок жовчних кислот у товстій кишці посилює її моторику, викликає діарею та стеаторею, а їх дефіцит у тонкій кишці призводить до порушення всмоктування жиророз-

чинних вітамінів і розвитку жовчнокам'яної хвороби. Особливо небезпечними є поява у пристінковому біотопі тонкої кишки таких аеробних представників, як лактозонегативні штами *E.coli*, гемолітичні форми ентеробактерій та стафілококи.

Таким чином, можна відмітити, що після припинення введення антибіотика відмічається надмірна колонізація бактеріями тонкої кишки, яка прогресує в часі, та може виступати одним з патогенетичних факторів хронічної рецидивної діареї, призводити до стеатореї, гіповітамінозу та білкової недостатності а також розвитку інших патологічних станів.

Heinsen зі співавт. [20] на біоптаті сигмоподібної кишки та фекальних зразків людини дослідили динаміку мікробіотного складу на фоні та після антибіотикотерапії пароміцином і показали зміни мікробіотного складу просвітних та фекальних зразків навіть через 6 тиж після відміни антибіотикотерапії. При цьому відрізнявся вміст ДНК та РНК, що свідчить не тільки про зміни мікробіотного складу, але і про різну активність його представників.

Ефект застосування різних схем введення антибіотика та мультипробіотика

Таблиця 2. Мікробіоценоз тонкого кишечника ($M \pm m$ lg КУО/г) після 14-добового введення цефтріаксону (300мг/мл)

Група мікроорганізмів	Контроль	Цефтріаксон і аутопсія		
		15-та доба	29-та доба	72-га доба
<i>Bifidobacterium</i>	5,0 \pm 0,5	7,4 \pm 0,1	7,7 \pm 0,2	7,2 \pm 0,2
<i>Lactobacillus</i>	5,0 \pm 0,2	4,9 \pm 0,3	5,0 \pm 0,2	6,0 \pm 0,1
<i>Propionibacterium</i>	3,3 \pm 0,1	5,1 \pm 0,3	0*	0*
<i>Bacteroides</i>	1,5 \pm 0,2	6,0 \pm 0,1	4,3 \pm 0,3	0*
<i>E.coli</i> з норм. фермент.влас.	0,8 \pm 0,2	0*	0*	0*
<i>E.coli</i> зі зміненими фермент.влас.	0,5 \pm 0,3	0*	0,8 \pm 0,4	0,3 \pm 0,3
Умовно-патогенні ентеробактерії	0*	0*	0*	2,1 \pm 0,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0*	0,8 \pm 0,4	0*	2,0 \pm 0,1
<i>Staphylococcus sp.</i> (маніт негат.)	0*	0,5 \pm 0,2	0*	2,5 \pm 0,5
<i>Clostridium sp.</i>	0*	1,2 \pm 0,2	3,3 \pm 0,3	0*
<i>Candida</i>	0*	4,0 \pm 0,2	0*	0*

0* – мікроорганізми не висівалися на відповідних середовищах

на структурні та функціональні показники слизової оболонки тонкої кишки. Для підтвердження ролі мікробіоти у підтриманні морфофункціонального гомеостазу тонкої кишки було досліджено стан слизової оболонки тонкої кишки за різних режимів введення мультипробіотика разом з антибіотиком чи після антибіотикотерапії.

При введенні антибіотика і мультипробіотика спостерігалися атрофічні процеси слизової оболонки, що підтверджувалися зниженням основних морфометричних показників порівняно з контролем та супроводжувалися зниженням рівня функціональної активності, виражена атрофія ворсинок (див. табл.1; рис.1,2). Кількість гранул у тучних клітинах була на рівні контрольних значень (див. рис.3). Отже, одночасне введення мультипробіотика і антибіотика не дає змоги усунути атрофію слизової оболонки тонкого кишечника, гіпертрофію ентероцитів і келихоподібних клітин і не є ефективною схемою.

При застосуванні антибіотика (1-14 діб) та мультипробіотика (15-28 діб) зростали основні морфометричні показники ентероцитів, розташованих у ворсинках: їх висота та площа ядер (див. рис.1). Слизові келихоподібні клітини у криптах менше гіпертрофовані, але не відновлювалися до контролю, а у ворсинках площа поперечного перерізу цих клітин сягала контрольних значень (див. рис.1). Кількість гранул у тучних клітинах менша, ніж у контрольній групі (див. рис.3). На 72-гу добу атрофічні процеси у тонкій кишці не виражені, були нижчим за ступінь гіпертрофії ентероцитів та келихоподібних клітин, проте залишалися дегранульованими тучні клітини, що свідчить про продовження процесів запалення у слизовій оболонці тонкої кишки після анти- та пробіотикотерапії (див. табл.1, рис.1-3). При мікробіологічному дослідженні біопатів тонкої кишки за цієї схеми виявилось, що такий спосіб профілактики характеризується позитивним ефектом. Так, відмічається нормалізація кількості цукролітичних бактерій - *Bifidobacterium* $7,5 \pm$

$0,1$ КУО/см², *Lactobacillus* $6,0 \pm 0,1$ КУО/см² у тонкій кишці порівняно з курсом введенням лише цефтріаксону.

При сумісному введенні антибіотика і мультипробіотика (1-14 діб) та самого мультипробіотика (15-28 діб) на 29-ту добу товщина слизової оболонки та глибина крипт була меншою порівняно з контрольною групою за рахунок зниження висоти ворсин (див. табл.1). Келихоподібні клітини крипт дещо гіпертрофовані відносно контролю (див. рис.2), кількість гранул відновлена (див. рис.3). Спостерігається різниця у функціональній активності крипт та ворсин: якщо у криптах їх висота та площа перерізу ядер свідчать про зниження їх функціональної активності, то у ворсинах спостерігаються протилежні процеси, що говорять про їх підвищення. Отже, відбуваються активні процеси відновлення епітеліального шару слизової оболонки тонкої кишки. За мікробіологічними показниками, ефект аналогічний до застосування мультипробіотика.

На 72-гу добу експерименту після припинення введення антибіотика з мультипробіотиком повністю усувалися негативні наслідки антибіотикотерапії (див. табл.1, рис.1-3). Відомо, що цілісність кишкового бар'єра підтримується бактеріями-коменсалами та пробіотиками. Епітеліоцити експресують рецептори до епітеліального фактора росту, які при своїй активації викликають зміцнення епітеліального бар'єра та підвищення експресії щільних контактів, пробіотичні мікроорганізми, можуть брати участь у посиленні цієї відповіді [21]. 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-ту 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 [22].

У цьому дослідженні антибіотик, окремо чи у комплексному застосуванні з мультипробіотиком спричиняють структурні та функціональні зміни епітеліального шару слизової оболонки тонкої кишки щурів. У літературі не зустрічаються дані про зміни мікробіотного складу тонкої кишки на фоні та після введення антибіотиків та змін її морфометричних показників. Проте у дослідженнях Bures зі співавт. [23] було виявлено аналогічні переміни морфометричних показників під дією представника нестероїдних протизапальних засобів індометацину у тонкій кишці свиней. При цьому найбільших змін слизова оболонка шлунка, тонкої та товстої кишок зазнавали при одночасній дії індометацину та пробіотика. На нашу думку, на фоні зрушень мікробіотичного складу вмісту тонкої кишки під дією як антибіотика, так і мультипробіотика, відбувався розвиток захисної реакції. Скоріш за все, опосередкованої каскадом імунологічних реакцій, викликаних зрушеннями складу мікробіоти, її контактом з епітеліальними клітинами, внаслідок зменшення продукції слизу келихоподібними клітинами та локацією бактерій-коменсалів.

ВИСНОВКИ

1. Введення антибіотика цефтріаксону протягом 14 діб знижує функціональну активність слизової оболонки тонкої кишки (зменшення товщини слизової оболонки, зниження висоти ворсин та глибини крипт), що асоціюється з наявністю прозапальних змін, зокрема, дегрануляції у тучних клітинах слизової оболонки та гіпертрофії келихоподібних клітин. Такі морфофункціональні зміни спостерігаються у віддалені терміни після введення антибіотика.

2. Структурні та функціональні особливості слизової оболонки тонкої кишки тісно пов'язані зі змінами у складі пристінкової

мікробіоти, яка характеризувалась ростом умовно патогенної мікробіоти, зокрема, *Staphylococcus aureus*, грибів роду *Candida*.

3. Найбільш ефективним режимом застосування мультипробіотика для попередження структурних та функціональних змін в тонкій кишці щурів за умов введення антибіотика є його комплексне використання протягом 14 діб та після завершення антибіотикотерапії або споживання лише мультипробіотика.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

A.V. Putnikov, I.M. Vareniuk, N.M. Roslova, Y.V. Holota, T.V. Dovbynychuk, T.M. Chervinska, T.M. Sergiychuk, M.E. Dzerzhynsky, G.M. Tolstanova

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF SMALL INTESTINE MUCOUS DEPENDING ON QUANTITATIVE AND QUALITATIVE MICROBIOTA COMPOSITION

In this work the morphological and functional features of the small intestine mucosa depending on microbiota of parietal small intestine in long term use antibiotic ceftriaxone and multiprobiotic or their co-administration were studied. Study was done on white laboratory rats, which were administrated daily with ceftriaxone antibiotic alone or along with multiprobiotic within 14 days, the autopsy was done on the 15th, 29th and 72nd days of the experiment. It was shown that antibiotic use caused morphological and functional state changes of the small intestine mucosa of rats, accompanied by hypertrophy of goblet cells and mast cell degranulation. The consequences of the antibiotic use remain even in periods after and not completely disappear at 29th and 72nd days of experiment. Morphofunctional changes of small intestinal mucosa constrained with changes in composition of intestinal microbiota that was characterized by the height of conditionally-pathogenic microbiota, in particular, *Staphylococcus aureus* and *Candida*. A chart of simultaneous application and abolition of multiprobiotic with an antibiotic is ineffective for the removal of negative consequences of introduction of antibiotic. Application of multiprobiotic together with an antibiotic and continuation of application of the multiprobiotic alone, or administration

of multiprobiotic after antibiotic cessation are considerably more effective comparatively with the first mode and allows to decrease or fully remove violation of the functional state of mucous membrane of small intestine.

Keywords: small intestine; antibioticotherapy; mucosal morphofunctional state; microbiota; probiotic.

Taras Shevchenko National University of Kyiv; e-mail: gtolstanova@gmail.com

А.В. Путников, И.М. Варенюк, Н.М. Рослова, Ю.В. Голота, Т.В. Довбинчук, Т.М. Червинская, Т.М. Сергийчук, М.Е. Дзержинський, Г.М. Толстанова

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОНКОЙ КИШКИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОТИОТЫ

Исследовали структурные и функциональные особенности слизистой оболочки тонкой кишки на белых лабораторных крысах в зависимости от микробиотного состава пристенка в течение 14 суток, аутопсию проводили на 15, 29 и 72-е сутки от начала экспериментов отдаленные сроки применения цефтриаксону отдельно или в комплексе с мультипробиотиком. Показано, что их применение вызывает изменения структурного и функционального состояния слизистой оболочки тонкой кишки крыс, сопровождающихся гипертрофией бокаловидных клеток и дегрануляцией тучных клеток. Последствия применения этих препаратов сохраняются в отдаленные сроки после его отмены, в частности, на 29-е и 72-е сутки эксперимента. Изменения в слизистой оболочке тонкой кишки тесно связаны с изменениями в составе пристеночной нормобиоты, которая характеризовалась ростом условно-патогенной микробиоты, в частности, *Staphylococcus aureus*, грибов рода *Candida*. Схема одновременного применения и отмены мультипробиотика с антибиотиком малоэффективна для устранения негативных последствий введения антибиотика. Антибиотик вместе с мультипробиотиком и продолжение применения второго, а также последовательное введение их в комплексе соответственно значительно эффективнее по сравнению с первым режимом и позволяет уменьшить или полностью устранить нарушения структурного и функционального состояния слизистой оболочки тонкой кишки.

Ключевые слова: тонкий кишечник; антибиотикотерапия; структурное и функциональное состояние слизистой оболочки микробиота; пробиотик.

REFERENCES

1. Kucherenko NP. Study of morphological changes of rat

intestine under prolonged action of antibioticotherapy. Ukr Med Almanac. 2003;6(2):167 - 71. [Russian].

2. Korneichuk OP. Microbiocenosis of patients with chronic colitis intestines and colonic tumors. Exp and Clin Physiol & biochemistry. 2000;3:125 - 27.
3. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:3 - 20.
4. Fries W, Belvedere A, Vetrano S. Sealing the broken barrier in IBD: intestinal permeability, epithelial cells and junctions. Curr Drug Targets. 2013;14:1460 - 470.
5. Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:23 - 34.
6. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. Allergol Int. 2013;62:151 - 61.
7. Simeoli R, Raso G, Lama A, Pirozzi C, Santoro A, Guida F, Sanges M, Aksoy E, Calignano A, D'Arienzo A, Meli R. Preventive and Therapeutic Effects of Lactobacillus Paracasei B21060-Based Synbiotic Treatment on Gut Inflammation and Barrier Integrity in Colitic Mice. J Nutr. 2015;145:1202 - 10.
8. Dovbynychuk T, Zakordonets L, Putnikov A, Vareniuk I, Tiapko O, Roslova N, Sergiychuk T, Lynchak O., Dzerzhynsky M, Beregova T, Tolstanova G. Net water transport via rat colon epithelium under the experimental dysbiosis. Fiziol Zh. 2015;61(6):76 - 85. [Ukrainian].
9. Yanfei Chen, Feng Ji, Jing Guo, Ding Shi, Daiqiong Fang & Lanjuan Li. Dysbiosis of small intestinal microbiota in liver cirrhosis and its association with etiology. Sci Rep. 2016;6(34055):1012 - 19.
10. Lin HC, et al. Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. JAMA. 2004 Aug 18;292(7):852 - 58.
11. Dukowicz AC, Lacy BE, Levine GM. Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Comprehensive Review. Gastroenterol & Hepatol. 2007;3(2):112 - 22.
12. Kuhn KA, Stappenbeck TS. Peripheral education of the immune system by the colonic microbiota. Semin Immunol. 2013;25(5):364 - 69.
13. Hajela N, Nair G, Abraham P, Ganguly P, Nirmal K. Health impact of probiotics - vision and opportunities. Gut Pathog. 2012;4(1):1.
14. Aihara E, Engevik KA, Montrose MH. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. Annu Rev Physiol. 2017;79:357 - 80.
15. Makkink M, Schwerbrock N, Mähler M et al. Fate of goblet cells in experimental colitis. Dig Dis Sci. 2002;47:2286 - 297.
16. McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, and Miller MJ. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ DCs in the small intestine. Nature. 2012;483(7389):345 - 49.
17. 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.

18. Ng J., et al. Clostridium difficile toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. Gastroenterology. 2010;139:542 - 52.
19. Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for Clostridium difficile Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. mSphere. 2016;6;1(1): e00045-15.
20. Heinsen FA, Knecht H, Neulinger S et al. Dynamic changes of the luminal and mucosa-associated gut microbiota during and after antibiotic therapy with paromycin. Gut Microbes. 2015; 6(4):243 - 54.
21. 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.
22. 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.
23. Bures J, Pejchal J, Kvetina J et al. Morphometric analysis of the porcine gastrointestinal tract in a 10-day high-dose indomethacin administration with or without probiotic bacteria Escherichia coli Nissle 1917. Hum Exp Toxicol. 2011; 30(12):1955 - 962.

*Матеріал надійшов до
редакції 22.02.2017*