ДОВБИНЧУК ТАЇСА ВОЛОДИМИРІВНА. Назва дисертаційної роботи: "МЕХАНІЗМ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ ГРУПИ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ НА ТРАНСПОРТ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ"

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ДОВБИНЧУК ТАЇСА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 612.362/.364:577.181.5+615.33

МЕХАНІЗМ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ ГРУПИ ЦЕФАЛОСПОРИНІВ НА

ТРАНСПОРТ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ

КИШКИ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Толстанова Ганна Миколаївна

Київ – 2016

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……………………………………… 5

ВСТУП…………………………………………….………………………… 6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ………………………………………… 12

1.1. Етіопатогенез антибіотикасоційованої діареї ……………………... 12

1.1.1. Епідеміологія антибіотикоасоційованих діарей…………. 12

1.1.2. Механізми розвитку антибіотикоасоційованої діареї………. 13

1.2. Загальна характеристика антибіотиків ряду цефалоспоринів…….. 15

1.2.1. Цефтріаксон – антибіотик ІІІ покоління цефалоспоринового

ряду…………………………………………………………………… 18

1.3 Транспортна функція епітелію товстої кишки…………………….. 20

1.3.1. Механізми транспорту води через епітелій товстої кишки… 20

1.3.2. Механізми транспорту Na+

через епітелій товстої кишки:

електронейтральне та електрогенне всмоктування...……………… 22

1.3.3. Транспорт Clчерез епітелій товстої кишки: електрогенне

та електронейтральне всмоктування та секреція..…………………. 23

1.3.4. Механізми секреції К

+

через епітелій товстої кишки………. 25

1.3.5. Транспорт НСО3

-

через епітелій товстої кишки…………….. 25

1.4. Вплив антибіотиків на транспортну функцію епітелію…………… 26

1.5. Роль тучних клітин в регуляції транспортної функції епітелію

товстої кишки……………………………………………………….... 28

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ…………………………………….... 32

2.1. Об’єкт дослідження………………………………………………….. 32

2.2. Схеми експериментів ………………………………………………... 32

2.4. Визначення транспортної функції епітелію товстої кишки,

методом перфузії ізольованої ділянки in situ …………………….. 34

2.4.1. Перфузія ізольованої ділянки товстої кишки in situ……..…. 34

2.4.2. Визначення сумарного потоку води…………………………. 35

2.4.3. Визначення сумарного потоку Na+

та K

+…………………….. 36

3

2.4.4. Визначення сумарного потоку Cl–…………………………… 37

2.5. Гістологічний аналіз товстої кишки……………………………….. 38

2.5.1. Морфометричний аналіз гістологічних зрізів……………… 38

2.5.2. Цитохімічне визначення тучних клітин…………………….. 38

2.6. Вестерн-блот аналіз…………………………………………………. 39

2.7. Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією…… 40

2.8. Визначення секреції слизу…………………………………………... 41

2.9. Статистична обробка отриманих результатів……………………… 42

РОЗДІЛ 3. СУМАРНИЙ ПОТІК ВОДИ, Na+

, К+

ТА СІ- ЧЕРЕЗ

ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКІВ ………. 43

3.1. Дослідження впливу цефтріаксону на транспорт води та

електролітів через епітелій товстої кишки щурів………………….. 43

3.1.1. Дослідження впливу 5-добового введення цефтріаксону на

транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки

щурів………………………………………………………………….. 43

3.1.2. Дослідження впливу 14-добового введення цефтріаксону на

транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки

щурів………………………………………………………………….. 47

3.2. Дослідження впливу цефіксиму на транспорт води та

електролітів через епітелій товстої кишки щурів…………………. 50

3.3. Дослідження впливу азитроміцину на транспорт води та

електролітів через епітелій товстої кишки щурів………………….. 52

РОЗДІЛ 4. МЕХАНІЗМИ ДІЇ АНТИБІОТИКІВ НА ТРАНСПОРТНУ

ФУНКЦІЮ ЕПІТЕЛІЮ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ……………………. 56

4.1. Дослідження ролі іонних транспортерів та аквапоринового

транспорту в механізмах дії антибіотиків на транспортну функцію

товстої кишки……………………………………………….................. 56

4.1.1. Експресія транспортерів йоннів в слизовій оболонці товстої

кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону…. 56

4

4.1.2. Роль аквапоринових каналів AQP8 в механізмах

антибіотикасоційваної діареї після введення цефтріаксону та

азитроміцину………………………………………………………….. 60

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

добового введення цефтріаксону………………………………….. 65

4.3. Роль гістаміну в механізмах антибіотик-викликаних порушень

транспортної функції епітелію товстої кишки……………………… 67

4.3.1 Морфометричний аналіз гістологічних зрізів товстої кишки

щурів після введення цефтріаксону………………............................. 68

4.3.2. Порівняльний аналіз ступеня дегрануляції тучних клітин

після введення цефтріаксону та азитроміцину…………………….. 69

4.3.3. Дослідження впливу гістаміну на транспорт води та

електролітів через епітелій товстої кишки щурів…………………. 71

4.3.4. Дослідження ролі Н1-гістамінових рецепторів в механізмах

цефтріаксонвикликаної діареї у щурів……………………………… 72

РОЗДІЛ 5. ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ ПРОБІОТИКІВ В ПОПЕРЕДЖЕНІ

ПОРУШЕНЬ ТРАНСПОРТУ ВОДИ ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ

ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКІВ…….… 77

5.1. Вплив мультипробіотика на транспорт води та електролітів через

епітелій товстої кишки щурів……………………………………….. 77

5.2. Вплив сахароміцета на транспорт води та електролітів через

епітелій товстої кишки щурів……………………………………….. 82

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ…………. 89

ВИСНОВКИ………………………………………………………………….. 107

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ………………………………….... 109

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ААД – антибіотикасоційована діарея

цАМФ – циклічний аденозин монофосфат

ШКТ – шлунково–кишковий тракт

AQP – аквапоринові канали

CFTR – трансмембранний регулятор муковісцидозу

DRA – Cl–

/OH–

обмінник

ENaC – епітеліальний Na+

канал

NHE – Na+

/H

+

обмінник

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

КЛЖК - коротколанцюгові жирні кислоти

ПЗП – пеніцилін-звязуючі протеїни

цГМФ – циклічний гуанозин-монофосфат

6

ВСТУП

Актуальність теми. Товста кишка є важливим фізіологічним бар’єром

на шляху виникнення діареї. Її всмоктувальна здатність у людини сягає 6 л

води за добу і, лише, у випадку її підвищеного надходження виникає діарея

[1]. Всмоктування води через епітелій товстої кишки відбувається пасивно за

осмотичним градієнтом, який створюється транспортом електролітів,

переважно СІта Na+

, парацелюлярно через міжклітинні проміжки. Також,

часткове всмоктування відбувається трансцелюлярно за допомогою

аквапоринових каналів мембрани колоноцитів [2]. Всмоктувальна функція

кишечника знаходиться у тісному взаємозв’язку з життєдіяльністю кишкової

мікробіоти. Зрушення в її складі впливають на рівень колонізаційної

резистентності та є причиною розвитку місцевого запального процесу, це

може призводити до змін у всмоктувальній функції кишечника [3].

Встановлено прямий ефект окремих пробіотичних штамів, зокрема

біфідобактерій та лактобактерій, на секреторну функцію кишечника та

експресію іонних транспортерів [4-5].

Одним з найчастіших симптомів, пов’язаних з прийомом антибіотиків,

є розвиток діареї. Антибіотикасоційована діарея (ААД) - це як мінімум три і

більше епізодів неоформленого випорожнення, які розвиваються на тлі

застосування антибактеріальних препаратів чи впродовж 4-8 тижнів після їх

відміни. Частота розвитку такого стану становить 5-30% [6-7]. Згідно з

сучасною теорією етіопатогенезу ААД, не більше ніж 20% випадків

асоційовані з інфікуванням Clostridium difficiliе [8-9]. Решта випадків має

ідіопатичний характер (не виявлений конкретний збудник діареї) і залежить

від механізму антибактеріальної дії різних груп антибіотиків. Так, розвиток

ААД пов’язують з посиленням моторики кишечника (під дією макролідів з

14-членним лактонним кільцем); підвищенням внутрішньопросвітного

осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків

7

(цефоперазон, цефіксим); порушенням декон’югації жовчних кислот чи змін

вмісту коротколанцюгових жирних кислот, при зрушеннях у складі та

метаболічній активності кишкової мікробіоти (характерно для антибіотиків

широкого спектра дії: флуороквінолони, цефалоспорини, кліндаміцин тощо)

[10].

Існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну

функцію епітелію кишечника in vitro, наприклад, за умов

внутрішньопросвітної перфузії ізольованої ділянки кишечника [11], інкубації

культури епітеліоцитів [109] чи ізольованої ділянки кишечника [12]

розчином антибіотиків. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої

кишки в патогенезі ААД за умов системного впливу антибіотиків не

досліджувалося; не встановлені молекулярні механізми порушення

транспортної функції епітелію товстої кишки за дії антибіотиків; не

зрозумілим залишається питання транзиторного характеру діареї на фоні

введення антибіотику.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках бюджетної теми 11БФ-03601

«Механізми реалізації адаптаційно-компесаторних реакцій організму за умов

розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та гранта

Президента України для обдарованої молоді «Розробка методів

прогнозування та профілактики порушень в шлунково-кишковому тракті,

викликаних антибактеріальною терапією» (договір № 12/2011). Тема

дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут

біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

протокол № 6 від 10 грудня 2012 року.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з’ясувати

механізми транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки

щурів за дії антибіотиків та розробити методи їх корекції.

Відповідно до мети перед нами були поставлені такі завдання:

8

1. Вивчити показники сумарного транспорту води та електролітів через

епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків ряду цефалоспоринів

та макролідів.

2. Дослідити експресію транспортерів йоннів Na+

, Clта аквапоринових

каналів AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів за дії

антибіотиків ряду цефалоспоринів та макролідів.

3. Визначити рівень секреції слизу в товстій кишці щурів за дії

антибіотику ряду цефалоспоринів.

4. Визначити роль гістаміну та Н1-гістамінових рецепторів в механізмах

антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію

товстої кишки у щурів.

5. Провести порівняльний аналіз механізмів, що лежать в основі

порушення транспортної функції епітелію товстої кишки щурів за дії

антибіотиків ряду цефалоспоринів та макролідів.

6. Дослідити профілактичну дію пробіотиків в попередженні порушень

транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів

за дії цефалоспорину.

Об'єкт дослідження: механізм дії антибіотиків на транспорт води та

електролітів через епітелій товстої кишки.

Предмет дослідження: сумарні потоки води та електролітів (Na+

, K

+

,

Cl–

) через епітелій товстої кишки; активність тучних клітин; секреція слизу за

дії антибіотиків та їх корекція пробіотиками.

Методи дослідження. У роботі використовували фізіологічні,

біохімічні, спектрофотометричні, колориметричні, молекулярні, гістологічні,

цитохімічні, фармакологічні методи та методи варіаційної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі отримані

принципово нові дані щодо механізмів ідіопатичної ААД, з огляду на

порушення транспортної функції епітелію товстої кишки. Вперше

встановлено, що порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, як

механізму ААД, характерно лише для певних груп антибіотиків, зокрема

9

антибіотику цефалоспоринового ряду ІІІ покоління цефтріаксону. Зрушення

у транспортній функції епітелію товстої кишки після внутрішньом`язового

введення цефтріаксону пов'язано зі змінами в експресії йонних транспортерів

(NНЕ3, ENaC, CFTR) та аквапоринового транспортеру AQP8. Ці показники

відрізняються після короткого (5 днів) та довготривалого (14 днів) курсу

введення антибіотику, що співпадає зі змінами у клінічних проявах діареї і,

відповідно, може бути обґрунтуванням транзиторної природи клінічних

проявів ААД.

Встановлено, що введення антибіотиків зумовлює розвиток

прозапальних змін в слизовій оболонці товстої кишки. Цей ефект, принаймні

частково, опосередковується через вивільнення гістаміну із тучних клітин та

його взаємодії з Н1-гістаміновими рецепторами.

Застосування антибіотиків супроводжується змінами секреції слизу, що

призводить до порушення слизового бар’єру кишечника.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконано весь обсяг

досліджень транспортної функції епітелію товстої кишки, визначення

секреції слизу. В проведенні молекулярних досліджень по визначенню

експресії протеїнів транспортерів допомагали м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М. та

н.с., к.б.н. Драніцина А.С. Доцент, к.б.н. Варенюк І.М. та н.с., к.б.н. Линчак

О.В. надавали консультативну допомогу при проведенні гістологічних та

цитохімічних досліджень. Мультипробіотик був наданий д.б.н., проф.

Янковським Д.С. (НВК «О.Д. Пролісок»). Самостійно проведене статистичне

опрацювання одержаних результатів, підібрана та проаналізована література

за темою дисертації. В обговоренні результатів дослідження брали участь

співавтори наукових публікацій, зокрема, окрему подяку висловлюю проф.,

д.б.н. Т.В. Береговій та к.м.н. Закордонець Л.В. Планування напрямків

досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків

здійснено за участю наукового керівника.

Практичне значення одержаних результатів. В роботі

експериментально доведена доцільність сумісного застосування

10

мультипробіотика («Симбітер®

ацидофільний» концентрований) чи

пробіотика небактеріальної природи на основі Saccharomуces boulardii (S.

boulardii) (Ентерол®

250) на фоні антибіотикотерапії, для попередження

порушень транспортної функції епітелію товстої кишки і, відповідно,

клінічних проявів ААД.

Встановлено, що блокада Н1-гістамінових рецепторів попереджає

антибіотиквикликані порушення транспортної функції епітелію товстої

кишки. Це дозволяє рекомендувати застосування антигістамінних препаратів,

зокрема блокатора Н1-гістамінових рецепторів лоратадину (Кларитин®

), не

лише для запобігання алергічних реакцій, які часто супроводжують прийом

антибіотиків, але й для попередження розвитку діареї.

Матеріали дисертації включені до спецкурсів «Фізіологія травлення та

харчування» та «Фізіологічна фармакологія» на кафедрі фізіології людини і

тварин Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського

національного університету імені Тараса Шевченка, а також можуть бути

рекомендовані до включення у спецкурси медико-біологічних вищих

навчальних закладів.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної

роботи доповідалися та обговорювалися на: VІІІ Міжнародній конференції

студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012), United

European Gastroenterology Education “Basic Science Course: Epithelial ion

transport in the GI tract (Шеген, Угорщина, 2012), II Scientific Conference of

Young Physiologists ”Physiology: from Molecules to the Body” (Київ, 2012), 20th

United European Gastroenterology Week (Амстердам, Нідерланди 2012), ІХ

Міжнародній конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології».

– (Львів, 2013), 7

th International Сonference “Probiotics, prebiotics and new

foods” (Рим, Італія, 2013), Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія

та імунологія – перспективи розвитку в ХХІ столітті» (Київ, 2014), 8

th

International Symposium on Cell/Tissue Injury and

Cytoprotection/Organoprotection (Будапешт, Угорщина 2014), ХІ Український

11

біохімічний конгрес (Київ, 2014), Bukovinian International Medical Congress

(Чернівці, 2015), Науково-практична конференція «Мультипробіотики в

профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (Київ, 2015).

Публікації За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, що

відбивають основний зміст дисертаційної роботи: 7 статей у наукових

виданнях, з них 5 в рекомендованих ДАК України і 11 тез доповідей на

наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації Дисертація складається зі вступу,

огляду літератури, методів досліджень, розділу з викладенням отриманих

результатів, розділу, присвяченому аналізу й узагальненню результатів,

висновків та списку літератури, який складається з 206 найменувань.

Матеріали дисертаційної роботи викладені на 132 сторінках (з яких основна

частина займає 108 сторінки), ілюстрована 3 таблицями, 3

мікрофотографіями та 27 рисунками.

ВИСНОВКИ

Впершевстановленощопорушеннятранспортноїфункціїепітелію

товстоїкишкиякмеханізмуантибіотикасоційованоїдіареїхарактернолише

дляпевнихгрупантибіотиківзокремаантибіотикуцефалоспориновогоряду

ІІІпоколінняцефтріаксону

Парентеральневведенняантибіотикурядуцефалоспоринів

цефтріаксонувдозімгкгвпродовждібвикликалозменшення

всмоктуванняводиякенапочаткубулозумовленозменшенням

всмоктуваннянатріютасекрецієюкаліюЗізбільшеннямдозидомгкгта

тривалостівведенняантибіотиківдодібцізміниасоціювалисязі

збільшеннямсекреціїхлоруПероральневведенняантибіотиківряду

цефалоспоринівцефіксимумгкгтарядумакролідівазитроміцину

мгкгнавпакизбільшуваловсмоктуванняводипереважнозарахунок

підвищеноговсмоктуванняйонівхлоручерезепітелійтовстоїкишкищурів

Введенняцефтріаксонувпродовждібневикликалодостовірнихзмін

урівніпротеїнутамРНКалезменшуваловразимРНК

тапідвищуваловрази–мРНКПіслявведенняцефтріаксону

впродовжтидібзменшувавсявразирівеньпротеїнута

підвищувалосявразимРНКвразівмРНКтавразів

–мРНКОтжепорушеннятранспортноїфункціїепітеліютовстої

кишкищурівзадіїцефтріаксонупринаймічастковозумовленізмінамив

експресіїтранспортерівіонів



тааквапориновихканалівв

слизовійоболонцітовстоїкишкищурів

Зміниурівнісекреціїслизувтовстійкишціщурівзадіїантибіотику

цефтріаксонувідповідаютьзмінамурівнісекреціїхлоруПіслядобового

введенняцефтріаксонуспостерігалосьзначнезниженняапіслядобового

введеннянавпакизбільшеннясекреціїслизу



Введенняцефтріаксонувикликаєпрозапальнізмінивслизовій

оболонцітовстоїкишкищурівщосупроводжуєтьсядегрануляцієютучних

клітиносновниммедіаторомякихєгістамінГістамінсправляєаналогічну

доцефтріаксонупросекреторнудіюнатранспортводинатріютакалію

черезепітелійтовстоїкишкищурівБлокадаНгістаміновихрецепторів

лоратадиномпопереджаєклінічніпроявицефтріаксонвикликаноїдіареїщо

супроводжувалосьвідновленнямпоказниківсумарногопотокуводитакалію

черезепітелійтовстоїкишкищурів

Навідмінувідцефтріаксонуазитроміцинпідвищуєвсмоктувальну

здатністьепітеліютовстоїкишкищурівщосупроводжуєтьсязбільшенням

рівняпротеїнуаквапориновихканалівтахарактеризуєтьсявідсутністю

дегрануляціїтучнихклітинустінцітовстоїкишки

Комплекснезастосуваннямультипробіотикубактерійродів

іта

оцтовокислихбактерійзконцентрацієюживихклітиннеменше×

та

пробіотикунаосновіунафонітерапіїцефтріаксоном

попереджаєпросекреторнізмінивепітеліїтовстоїкишкиЦейефект

зумовленийпідвищеннямвсмоктуванняводиякеасоціювалосьзізмінамив

сумарномутранспортійонівкаліютанезалежаловідсумарноготранспорту

йонівнатріютахлору