СКОЧКО НАТАЛІЯ СЕРГІЇВНА. Назва дисертаційної роботи: "СЕКРЕТОРНА І ВСМОКТУВАЛЬНА ФУНКЦІЇ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ У ЩУРІВ В ОНТОГЕНЕЗІ"

Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

На правах рукопису

СКОЧКО НАТАЛІЯ СЕРГІЇВНА

УДК 591.1:612.3:612.6

СЕКРЕТОРНА І ВСМОКТУВАЛЬНА ФУНКЦІЇ ШЛУНКОВОКИШКОВОГО ТРАКТУ У ЩУРІВ В ОНТОГЕНЕЗІ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

доктор біологічних наук,

професор

Берегова Тетяна Володимірівна

Київ – 2015

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……………………………………………..5

ВСТУП………………………………………...………………………….................6

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Теорії старіння ………….…………..……………………………………..13

1.2. Стан секреторної функції шлунка в онтогенезі………………………….16

1.3. Вікові особливості транспорту води та електролітів через епітелій

товстої кишки …………………………………...………………………………...19

1.4. Вікові зміни мікрофлори в товстому кишечнику ………….…………….24

1.5. Пробіотики як засіб корекції

функціональних змін, викликаних старінням …………...……………….27

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об’єкти та умови дослідження………………………………..……….......35

2.2. Схема експерименту ………………………………..……………………...35

2.3. Отримання біологічного матеріалу…………………..………………........36

2.4. Дослідження шлункової секреції гідрохлоридної кислоти та пепсину....38

2.5. Дослідження транспорту води та електролітів через епітелій

товстої кишки.................................................................................................41

2.6. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів у

сироватці крові, гепатоцитах, тканині підшлункової залози і в

слизовій оболонці шлунка щурів…………………………...................................43

2.7. Визначення активності ферментів антиоксидантної системи у

сироватці крові, гепатоцитах, тканині підшлункової залози і в

слизовій оболонці шлунка щурів…………………………..................................44

2.8. Визначення вмісту азоту сечовини у сироватці крові…………………….45

2.9. Визначення видового і кількісного складу мікрофлори у

фекальних біоптатах................................................................................................46

2.10.Методи статистичної обробки одержаних результатів…………………....46

3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3 СЕКРЕТОРНА ФУНКЦІЯ ШЛУНКА У ЩУРІВ

В ОНТОГЕНЕЗІ…………………………………………………………………...42

3.1. Секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів різних

вікових груп……………………………………………………………………......48

3.2. Транспорт води і електролітів через епітелій товстої кишки у

щурів різних вікових груп………………………………………………………...52

РОЗДІЛ 4 СТАН АНТИОКСИДАНТНИХ СИСТЕМ ОРГАНІЗМУ,

ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ ТА БІОМАРКЕРИ СТАРІННЯ У ЩУРІВ ТА ЗА

УМОВ ПЕРІОДИЧНОГО ВВЕДЕННЯ ЇМ МУЛЬТИПРОБІОТИКА

4.1. Кількісний і якісний склад мікрофлори у щурів різних вікових груп…..57

4.2. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів і активність

ферментів антиоксидантного захисту у сироватці крові щурів

різних вікових груп та за умов періодичного введення їм мультипробіотика..59

4.3. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів і активність

ферментів антиоксидантного захисту у гепатоцитах щурів різних вікових

груп та за умов періодичного введення їм мультипробіотика…………….......66

4.4. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів і активність

ферментів антиоксидантного захисту у гомогенаті підшлункової залози

щурів різних вікових груп та за умов періодичного введення

їм мультипробіотика…………………………………………………………........73

4.5. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів і активність

ферментів антиоксидантного захисту у слизовій оболонці шлунка щурів

різних вікових груп та за умов періодичного введення

їм мультипробіотика…………………………………………………………........79

4.6. Тривалість життя і концентрація біомаркера старіння в сироватці

крові інтактних щурів та щурів за умов періодичного

введення мультипробіотика……………………………………………………....86

РОЗДІЛ 5 ШЛУНКОВА СЕКРЕЦІЯ І ТРАНСПОРТ ВОДИ

ТА ЕЛЕКТРОЛІТІВ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ У ЩУРІВ

4

ЗА УМОВ ПЕРІОДИЧНОГО ВВЕДЕННЯ ЇМ МУЛЬТИПРОБІОТИКА……..93

5.1. Секреція гідрохлоридної кислоти і пепсину у щурів за

умов періодичного введення їм мультипробіотика……………………………..94

5.2. Транспорт води і електролітів через епітелій товстої кишки у щурів

за умов періодичного введення їм мультипробіотика………………………......97

ЗАКЛЮЧЕННЯ…………………………………………………………………..103

ВИСНОВКИ………………………………………………………………….......126

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ………………………...……………...128

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕДТА — етилендіамінтетраетилацетат;

НАДН — нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений;

НСТ – нітросиній тетразолій;

СОД – супероксиддисмутаза;

ТБК – тіобарбітурова кислота;

ФМС – феназинметасульфат;

Н2О2 – пероксид водню;

HCl – гідрохлоридна кислота;

КЛЖК – коротколанцюгові жирні кислоти;

ТК – товста кишка;

ШО – шиффові основи;

ДК – дієнові кон’югати.

6

ВСТУП

Актуальність теми. Дослідження фізіологічних систем організму людини

з точки зору онтогенезу є актуальним завданням для нашого часу. Особлива

увага прикута до вивчення секреторної функції шлунка у різні вікові періоди,

так як саме від неї залежить ефективність і повноцінність травлення [1–3].

Також однією з причин актуальності даного напрямку досліджень є дискусія з

приводу того, чи є розвиток ахлоргідрії і навіть ахілії у людей похилого віку

вираженими віковими змінами або ж це результат тривалого патологічного

процесу (хронічний атрофічний гастрит, хронічна ішемія внаслідок

вираженого атеросклерозу черевних артерій та ін.) [4–7].

Дані літератури щодо впливу старіння на секреторну функцію шлунка

протиречиві. За даними одних авторів, у людей похилого віку дебіт базальної і

стимульованої іжею та гастрином-17 гідрохлоридної кислоти (HCl) в шлунку

більший, ніж у молодих [8]. За даними інших, старіння здорових людей

супроводжується підтриманням секреції HCl на постійному рівні і навіть має

тенденцію до зростання [5]. Діаметрально протилежні дані отримані іншими

авторами, які показали, що при старінні знижується базальна секреція

основних компонентів шлункового соку [6,9–11]. В ряді робіт Коркушка та

співавт. показано, що старіння супроводжується не лише зниженням базальної

шлункової секреції у людей, але і стимульованої гістаміном та

пентагастрином. Feldman співавт. [4] вважають, що похилий вік не справляє

впливу на секрецію HCl, але вони виявили зменшення секреції пепсину в

цьому віці. Є посилання на збільшену секрецію пепсину у жінок у віці понад

50 років [12].

Без належної уваги залишилося питання впливу транспорту води і

електролітів в динаміці на виникаючі закрепи в старому організмі. Так як

закрепи зустрічаються у 60% людей старше 60 років і можуть утруднювати не

7

тільки соціальне положення в суспільстві, а також несуть за собою такі

негативні наслідки, як підвищення тиску в порожнині кишечника,

дивертикули, дисбактеріоз та накопичення ендотоксинів [13,14]. Цей синдром

дуже часто зустрічається у хворих літнього віку, але робіт щодо вивчення та

лікування цієї проблеми у людей старечого віку, на жаль, мало. Отже, дана

проблема є актуальною для запобігання передчасного старіння та розробки

методів корекції вікових змін в травному тракті.

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

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень

Київського національного університету імені Тараса Шевченка і є фрагментом

теми Навчально-наукового центру «Інститут біології» «Механізми реалізації

адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних

патологій» № д/р 0111U004648 (2011-2015 рр.), № 11БФ036-01.

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – дослідити вікові

особливості секреторної функції шлунка і транспорту води та електролітів

через епітелій товстої кишки у щурів

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні

завдання:

1. Дослідити базальну і стимульовану секрецію гідрохлоридної

кислоти в шлунку щурів різних вікових груп.

2. Дослідити базальну і стимульовану секрецію пепсину в шлунку

щурів різних вікових груп.

3. Дослідити транспорт води та електролітів через епітелій товстої

кишки у щурів різних вікових груп.

4. Оцінити кількісний і якісний склад мікрофлори товстої кишки у

щурів молодого і старечого віку та у щурів старечого віку.

5. Визначити інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та

активність ферментів антиоксидантного захисту в сироватці крові,

гепатоцитах, гомогенаті підшлункової залози та слизовій оболонках шлунка у

8

щурів різних вікових груп та у щурів, яким періодично вводили

мультипробіотик.

6. Вивчити геропротекторний вплив мультипробіотика.

7. Дослідити вплив мультипробіотика на секреторну функцію шлунка

і транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки у щурів різних

вікових груп.

Об’єкт досліджень: функціонування шлунково-кишкового тракту та

відновлення його характеристик у щурів в процесі онтогенезу.

Предмет досліджень: параметри секреторної функції шлунка та

транспорту води і електролітів через епітелій товстої кишки, стан окисноантиоксидантної рівноваги у сироватці крові та органах травного тракту,

кількісний і якісний склад мікрофлори товстої кишки у щурів в онтогенезі і

при періодичному введенні мультипробіотика.

Методи дослідження: фізіологічні, біохімічні методи дослідження: метод

перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом (дослідження секреції

HCl у шлунку), метод перфузії ізольованої ділянки товстої кишки в умовах

досліду in vivo (дослідження транспорту води і електролітів через епітелій

товстої кишки), спектрофотометричні (визначення активностей

антиоксидантних ферментів, ферментів сироватки крові, продуктів ПОЛ та

пепсину за Тіном) та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в динаміці онтогенезу

в усіх вікових групах щурів досліджені секреція HCl і пепсину у шлунку та

транспорт води і електролітів через епітелій товстої кишки. Вперше показано,

що найменший рівень рівень базальної секреції HCl спостерігається у щурів

ювенільного віку, а найвищий – у щурів молодого віку. У зрілому віці він

зменшується вдвічі у порівнянні з щурами молодого віку і залишається на

такому рівні ж рівні в літньому і старечому віці. Дебіт HCl, стимульованої

карбахоліном, зазнавав періодичних коливань упродовж життя: найменшим

він був у щурів ювенільного, раннього зрілого і старечого віку, найбільшим - у

щурів пізнього зрілого і літнього віку. Базальна секреція пепсину була

9

найменшою у щурів раннього зрілого, літнього і старечого віку, а найбільшою

– у щурів ювенільного і молодого віку. Стимульована карбахоліном секреція

пепсину була найбільшою у щурів ювенільного і молодого віку, в процесі

старіння вона поступово знижувалась і найменшою вона була у щурів

старечого віку.

Вперше встановлено, що у щурів літнього і зрілого віку посилюється

всмоктування води, яке супроводжується посиленням всмоктування іонів

натрію і хлору, що є причиною розвитку закрепів.

В роботі підтверджена вільнорадикальна теорія старіння, а також зміна

кількісного та якісного складу мікрофлори у старечому віці, що дозволило

запропонувати періодичне вживання мультипробіотика «Симбітер

ацидофільний» концентрований в якості препарата, що запобігає віковим

змінам в секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку, усуває посилення

всмоктування води, іонів натрію і хлору в товстій кишці та уповільнює

старіння, що проявлялось у зменшенні концентрації в сироватці крові

біомаркера старіння – азоту сечовини та у збільшенні тривалості життя щурів

на 11,9% (p<0,05).

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати

розширюють, систематизують та створюють цільне уявлення про особливості

секреторної функції шлунка та транспорту води і електролітів через епітелій

товстої кишки у всі вікові періоди щурів.

Отримані результати свідчать про те, що дослідження нових

антисекреторних і антацидних препаратів, а також препаратів, що впливають

на транспорт води і електролітів, слід проводити на щурах різних вікових груп

з урахуванням виявлених особливостей, адже ефект таких препаратів залежить

від вихідного рівня секреції в шлунку та net-абсорпції в товстій кишці.

На основві отриманих результатів мультипробіотик можна рекомендувати

для проведення подальших клінічних досліджень, з перспективою його

застосуваання людям різних вікових груп для профілактики вікових змін в

травному тракті, уповільнення старіння та подовження тривалості життя.

10

Результати дисертаційного дослідження можуть бути використані у

викладанні курсів фізіології, порівняльної фізіології, вікової фізіології та

фізіології травлення у студентів медико-біологічних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконано пошук та

аналіз наукових літературних джерел за темою дисертації, проведено

експериментальні дослідження, статистичну обробку та теоретичне

обґрунтування одержаних результатів. Розробка ідеологічної концепція

обраної теми, методичних підходів, обговорення та аналіз отриманих даних

проведено за участю наукового керівника д.б.н., проф. Берегової Т.В.

Мультипробіотики були люб’язно надані проф., д.б.н. Янковським Д.С.

(НВК «О.Д. Пролісок»). Біохімічні дослідження проводились за

консультативною допомогою д.б.н. Дворщенко К.О. (зав. НДЛ «Біохімії» ННЦ

«Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса

Шевченка) та безпосередньою допомогою к.б.н. Торгало і к.б.н. Берник О.,

участь яких наведена у спільних публікаціях. Кількісний і якісний склад

мікрофлори товстої кишки визначали за участю співробітників кафедри

мікробіології і імунології ННЦ «Інститут біології».

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної

роботи доповідалися та обговорювалися на: 4-й міжнародній конференції

«Досягнення у фармакології та патології травного тракту» (Київ, Україна,

2012), VI конгресі патофізіологів України (Місхор, Крим, Україна, 2012), ХIV

конгресі світової федерації українських лікарських товариств (Донецьк,

Україна, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції "Актуальні

досягнення медичних наукових досліджень в Україні та в країнах ближнього

зарубіжжя" (Київ, Україна, 2012), ІХ міжнародній конференції студентів та

аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2013), 7-й ЛьвівськоЛюблінській конференції «Експериментальна і клінічна біохімія» (Львів,

Україна, 2013), Міжнародній науково-практичній конференції присвяченій

Всесвітньому дню здоров’я (Київ, Україна, 2013), VI міжнародній конференції

молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція» (Одеса,

11

Україна, 2013), 8-му Міжнародному симпозіумі «Клітинні/тканинні ураження

та цитопротекція/органопротекція» (Будапешт, Угорщина, 2014), ХІХ з’їзді

українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною

участю (Львів, Україна, 2015), 22-й Міжнародний студентський конгрес

(біо)медичних наук (Гронінгем, Нідерланди, 2015).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 17 працях, з

них 6 статей у фахових наукових виданнях, з яких 5 в журналах, що входять до

міжнародних наукометричних баз, та 11 у матеріалах та тезах міжнародних

наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу,

основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень,

результатів досліджень та їх обговорення), висновків та списку використаних

джерел (240 найменувань). Роботу викладено на 150 сторінках машинописного

тексту і проілюстровано 38 рисунками та 3 таблицями.

Висновки біоетичної експертизи. У дослідженнях використані білі

нелінійні щури розведення віварію Навчально-наукового центру «Інститут

біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах акредитованого

віварію згідно «Стандартним правилам з упорядкування, обладнання та

утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Впродовж усього

експерименту тварини не зазнавали жорстокого і негуманного поводження за

висновком комісії з питань біоетики Навчально-наукового центру «Інститут

біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка від 03

березня 2014 року (протоколу № 1 від 23 вересня 2014 року). Дослідження

відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними

тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту хребетних

тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших

наукових цілях [15], у відповідності до Закону України від 21.02.2006 № 3447-

IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [16] та згідно з етичними

нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами (Guide for the Care

12

and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington DC, 1996)

[17].

ВИСНОВКИ

Вдисертаційнійроботівідповіднодопоставленоїметидосліджена

секреторнафункціяшлункататранспортводиіелектролітівчерезепітелій

товстоїкишкиущурівурізнівіковіперіодитавиявленощоупроцесі

старінняпорушуютьсяфункціїтравноготрактуатакожзапропонованометод

їхкорекції

Зарезультатамивиконанняпоставленихвроботізадачзробленінаступні

висновки

Базальнасекреціягідрохлоридноїкислотившлункущурівюнацького

вікубуланабільшоюупорівняннізіщурамиювенільноговікуУ

щурівстаршихвіковихгрупбазальнасекреціягідрохлоридноїкислотив

шлункузменшуваласьприблизновдвічіупорівняннізщурамиюнацького

вікуУпорівняннізщурамиювенільноговікустимульованакарбахоліном

секреціягідрохлоридноїкислотившлункущурівзросталаувсівіковіперіоди

окрімстаречоговікуВстаречомувіцісекреціягідрохлоридноїкислоти

статистичнозначущеневідрізняласявідщурівювенільноговіку

Базальнасекреціяпепсинувшлункущурівюнацькоговікубулатакоюж

якущурівювенільноговікуУщурівранньогозрілоговікувоназменшувалась

наупорівняннізщурамиювенільноговікуізалишаласябез

істотнихзміндокінцяжиттяСтимульованакарбахоліномсекреціяпепсинув

шлункущурівнезмінюваласядодосягненнянимиранньоголітньоговікуВ

літньомувіцістимульованакарбахоліномсекреціяпепсинубулана

меншоюупорівняннізщурамиювенільноговікуізалишаласяна

такомужрівніущурівстаречоговіку

Ущурівлітньогоістаречоговікувтовстійкишцізбільшувалося

всмоктуванняводитаіонів

інатлінезмінноїсекреціїіонівК



Уфекальномубіоптатітовстоїкишкищурівстаречоговікурозвивався

дисбактеріоззменшуваласькількістьбактероїдівзросталакількість

знормальнимиізміненимиферментативнимивластивостями



атакожзросталакількістьумовнопатогеннихентеробактерійклостридійта

грибівроду

Впроцесістарінняущуріввсироватцікровітаорганахтравноготракту

порушуваласьпроантиоксидантнарівновагазнаростаннямвміступродуктів

перекисногоокисненняліпідівівиснаженняактивностіферментів

антиоксидантногозахисту

Періодичневведеннящурамупродовжжиттямультипробіотика

Симбітерсприялонормалізаціїбазальноїістимульованоїшлункової

секреціїгідрохлоридноїкислотиіневпливалонасекреціюпепсинуатакож

справлялопросекреторнийвпливнатранспортводиііонів

ічерез

епітелійтовстоїкишки

Ущурівстаречоговікуконцентраціюазотусечовинибіомаркера

старіннябуланабільшоюупорівняннізщурамиювенільного

вікуПеріодичневведеннящурамупродовжжиттямультипробіотика

зменшувалодорівняконтролюконцентраціюазотусечовиниіподовжувало

середнютривалістьжиттяна