

**Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

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

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Навчально-науковому центрі (ННЦ) «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник,
Толстанова Ганна Миколаївна,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України,
начальник науково-дослідної частини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Манько Володимир Васильович,
Львівський національний університет імені Івана Франка МОН України,
завідувач кафедри фізіології людини і тварин

доктор медичних наук, професор
Шевчук Віктор Григорович.

Захист відбудеться «2» листопада 2016 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», спеціалізована вчена рада Д 26.001.38

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал №12

Автореферат розісланий «29» вересня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38

Т.М. Фалалєєва

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 [Kunzelmann K., 2002]. Парацелюлярний транспорт води, через міжклітинні проміжки епітелію товстої кишки, відбувається пасивно за осмотичним градієнтом, який створюється транспортом електролітів, переважно Cl^- та Na^+ . Також, часткове всмоктування води відбувається трансцелюлярно за допомогою аквапоринових каналів мембрани колоноцитів [Ricanek P., 2015]. 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 [Li M., 2013]. Встановлено прямий вплив окремих пробіотичних штамів, зокрема біфідобактерій та лактобактерій, на секреторну функцію кишечника та експресію йонних транспортерів [Neuvelin E.A., 2010; Raheja G., 2010].

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% [Murphy J.L., 2016; Zakordonets L.V., 2015]. Згідно з сучасною теорією етіопатогенезу ААД, не більше ніж 20% випадків асоційовані з інфікуванням *Clostridium difficile* [Tracey L., 2015; Rohde C.L., 2009]. 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 внутрішньопросвітнього осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків (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, цефалоспорины, кліндаміцин тощо) [Костюкевич О.И., 2009].

Існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну функцію епітелію кишечника *in vitro*, які були отримані, за умов внутрішньопросвітньої перфузії ізольованої ділянки кишечника [Giannella R.A., 1981], інкубації культури епітеліоцитів [Roberts M., 1991] чи ізольованої ділянки кишечника [Goldhill J.M., 1996] 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 транзитного 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-компенсаторних 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:

1. Вивчити показники сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків ряду цефалоспоринів та макролідів.
2. Дослідити експресію транспортерів Na^+ , Cl^- та 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 H_1 -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 цефалоспоринової групи.

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; корекція пробіотиками антибіотиквикликаних зрушень.

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 антибіотику цефалоспоринового ряду III покоління цефтріаксону. Зрушення у транспортній функції епітелію товстої кишки після внутрішньом'язового введення цефтріаксону пов'язано зі змінами в експресії йонних транспортерів (NHE3, 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 H_1 -гістаміновими рецепторами.

Застосування антибіотиків супроводжується змінами секреції слизу, що призводить до порушення слизового бар'єру кишечника.

Практичне значення одержаних результатів. В роботі експериментально доведена доцільність сумісного застосування мультипробіотику («Симбітер[®] ацидофільний» концентрований) чи пробіотику небактеріальної природи на основі *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) (Ентерол[®] 250) на фоні антибіотикотерапії, для попередження порушень транспортної функції епітелію товстої кишки і, відповідно, клінічних проявів ААД.

Встановлено, що блокада H_1 -гістамінових рецепторів попереджає антибіотиквикликані порушення транспортної функції епітелію товстої кишки. Це дозволяє рекомендувати застосування антигістамінних препаратів, зокрема, блокатора H_1 -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» для студентів бакалаврів на кафедрі фізіології людини і тварин ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а також можуть бути рекомендовані до включення у спецкурси медико-біологічного профілю.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто виконано весь обсяг досліджень транспортної функції епітелію товстої кишки, визначено секрецію слизу. В проведенні молекулярних досліджень по визначенню експресії транспортерів допомагали н.с., к.б.н. Драніцина А.С. та м.н.с., к.б.н. Червінська Т.М. 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 проф., д.б.н. 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 висловлюємо проф., д.б.н. Т.В. Береговій та асистенту, к.м.н. Закордонець Л.В. Планування напрямків досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків здійснено за участю наукового керівника.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: VIII 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), IX Міжнародній конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології». – (Львів, 2013), 7th International Conference “Probiotics, prebiotics and new foods” (Рим, Італія, 2013), Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті» (Київ, 2014), 8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Будапешт, Угорщина 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), Bukovinian International Medical Congress (Чернівці, 2015), Науково-практичній конференції «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 МОН 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 використаних джерел, який складається з 206 найменувань. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 126 сторінках (з яких основна частина займає 104 сторінки), ілюстрована 3 таблицями, 3 мікрофотографіями та 27 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені на білих лабораторних щурах, масою 180-250 г, n=160, які утримувались в акредитованому віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 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 (Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») та узгоджено біоетичною комісією ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол №8 від 2 листопада 2015 року.

Схема експериментів. 1 серія — контрольна, щурам впродовж 5 (n=25), 7 (n=10) чи 14 днів (n=15) вводили 0,1 мл води для ін'єкцій (в.м.); 2 серія — щурам впродовж 5 днів вводили антибіотик цефтріаксон («Артеріум», ПАТ «Київмедпрепарат», Україна) в дозі 50 (n=14) чи 300 мг/кг (n=7) (в.м.); 3 серія — щурам впродовж 14 днів вводили антибіотик цефтріаксон в дозі 50 (n=7) чи 300 мг/кг (n=5) (в.м.); 4 серія — 7 днів (n=6) вводили антибіотик цефалоспоринового ряду III покоління цефіксим (Орхид Кемикалс енд Фармасьютикалс Лтд, Індія) в дозі 10 мг/кг (*per os*); 5 серія — 5 днів (n=6) вводили антибіотик ряду макролідів азитроміцин (ТОВ «Пліва Хорватія», Загреб Хорватія) в дозі 15 мг/кг (*per os*); 6 серія — одноразово вводили гістамін (Sigma-Aldrich, Німеччина) в дозах 1,8 (n=3); 3,6 (n=3); 7,2 мг/кг (n=7) (*i.p.*), чи в дозі 3,6 мг/кг*год (в.в.) (n=7) через годину від початку перфузії кишечника; 7 серія — 5 днів (n=3) вводили блокатор H₁-гістамінових рецепторів лоратадин (Шерінг-Плау Лабо Н.В., Бельгія) в дозі 1,7 мг/кг (*per os*); 8 серія — 5 днів (n=5) вводили лоратадин 1,7 мг/кг (*per os*) одночасно з цефтріаксоном 50 мг/кг (в.м.); 9 серія — 5 (n=9) чи 14 днів (n=6) вводили мультипробіотик («Симбітер[®] ацидофільний» концентрований; ТОВ фірма "О.Д. Пролісок", Україна) в дозі $1,6 \times 10^9$ КУО/кг (*per os*); 10 серія — 5 (n=6) чи 14 днів (n=6) вводили мультипробіотик за 15 хв до введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.); 11 серія — протягом 5 (n=7) чи 14 днів (n=11) вводили *S. boulardii* (Ентерол[®] 250, Biocodex, Франція) в дозі 10 мг/добу (*per os*); 12 серія — впродовж 5 (n=8) чи 14 днів (n=6) вводили *S. boulardii* за 15 хв до введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.). На наступний день після останнього введення речовин проводили визначення сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки, методом перфузії ізольованої ділянки товстої кишки *in situ* [Scheld H.P., 1966]. Тварин наркотизували уретаном (Sigma Aldrich, США) в дозі 1,15 г/кг (*i.p.*). Кишку перфузували модифікованим ізотонічним фізіологічним розчином Кребса-Хенселейта (ммоль/л): NaCl — 117; KCl — 5,9; NaHCO₃ — 24,8; CaCl₂ — 2,5; MgCl₂ — 1,2; NaH₂PO₄ — 1,2; глюкоза — 5,5; pH=7,4 з додаванням 20 мг/л неабсорбованого маркеру фенолового червоного (ТОВ Альфарус, Україна). Визначали сумарні потоки (J_{net}) води та електролітів у 20-хвилинних пробах аспірованого розчину. Евтаназію щурів проводили шляхом введення летальної дози наркозу. J_{net} води, визначали за концентрацією фенолового червоного, шляхом колориметричного аналізу на спектрофотометрі (Synergy HT BioTek), при трьох довжинах хвиль 520, 560, 600 нм для врахування поправки на неспецифічну абсорбцію [Allen W.M., 1950]. Концентрацію Cl⁻ у перфузаті вимірювали за допомогою Cl⁻-селективного електрода на йонімірі (СВ-74); Na⁺ та K⁺ — за допомогою полум'яно-фотометричного аналізатора рідин (ПАЖ-74).

J_{net} вираховували за формулами [Scheld H.P., 1966; Sladen G.E., 1972]. Позитивне значення виражало процес всмоктування, негативне – секрецію.

Морфометричний аналіз проводили на парафінових зрізах (3-5 мкм) товстої кишки забарвлених гематоксиліном-еозином. Для цитохімічної ідентифікації тучних клітин використовували набір толуїдинового синього (ТОВ "БіоВитрум", Росія), з подальшим підрахунком числа гранул на клітину.

Методом Вестерн-блот аналізу визначали рівень протеїнів в тотальному екстракті слизової оболонки товстої кишки, з використанням первинних антитіл AQP8 та β -актин ("Sigma-Aldrich"), CFTR («Santa Cruz Biotechnology»).

Експресію мРНК в тотальному екстракті слизової оболонки товстої кишки визначали методом ПЛР зі зворотною транскрипцією. Екстракцію РНК проводили фенольним методом [Chomczynski P., 1987]. Отримання кДНК та полімеразну ланцюгову активність визначали згідно з [Maniatis T., 1984]. У реакціях були використані послідовності праймерів для: CFTR – прямий – actcttcttcagctggaccacacca та зворотній – aaagcatcgccggaggcggt; Aqp8 – прямий – cagatatgtctggggagcagacgc та зворотній – cagatatgtctggggagcagacgc; Scnn1b – прямий – attccagccccttcagtag та зворотній – gggtactggtggtgttggt; Slc9a3 – прямий – cctgatggggcgaactgaaga та зворотній – gcagtgactccccaacaaaca, та β -актин – прямий – tgggacgatatggagaagat та зворотній – attgccgatagtgatgacct.

Рівень секреції слизу в товстій кишці визначали за ШИК-реакцією на PVDF мембрані [Akiba Y., 2000].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Statistica 8.0. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл даних, застосовуючи W тест Шапіро-Вілка. Показник вірогідності розраховували за t-тестом Стюдента для вибірок з нормальним розподілом чи непараметричним методом за U-тестом Манна-Уїтні для ненормально розподілених вибірок. Результати представлені у вигляді середнього значення $\pm$ стандартного відхилення ($M \pm SD$), n – кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сумарний потік води, Na^+ , K^+ та СГ через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків. Антибіотики широкого спектру дії ряду макролідів (азитроміцин) та цефалоспоринів (цефтріаксон, цефіксим) є найбільш вживаними в клінічній практиці. За механізмом дії цефалоспоринони мають бактерицидний ефект, а макроліди - бактеріостатичний [Poulsen S.M., 2000; Bush K., Bradford P.A., 2016]. За даними літератури, при призначенні цефалоспоринів діарея виникає у 4-9% випадків, а макролідів - 2-5% [Костюкевич О.И., 2010].

Нами встановлено (рис. 1), що на 2-й день після введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг діарея розвивалась у 6% тварин. На 4-й день цей показник падав до 0%. На 6-й день - знов збільшувався до 12%. На 12-й день ми спостерігали

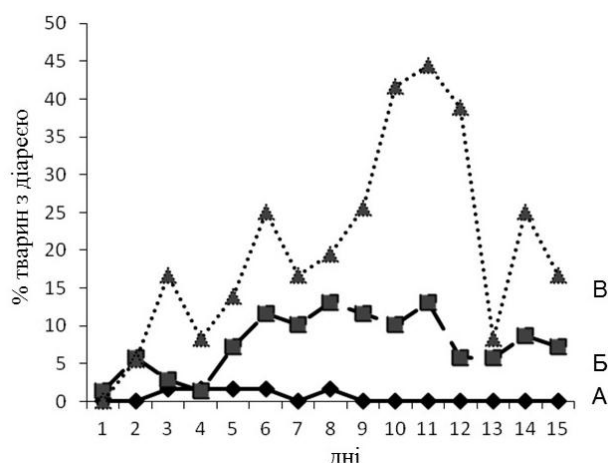


Рис. 1. Розвиток діареї у контрольної групи (А) щурів та на фоні введення цефтріаксону в дозах 50 мг/кг (в.м.) (Б) та 300 мг/кг (в.м.) (В).

ААД на тлі введення цефтріаксону. Далі ми перевірили наскільки клінічні прояви діареї пов'язані зі змінами у транспортній функції епітелію товстої кишки щурів за дії різних груп антибіотиків. Введення цефтріаксону впродовж 5 діб в дозі 50 мг/кг викликало зменшення всмоктування води на 47,5%

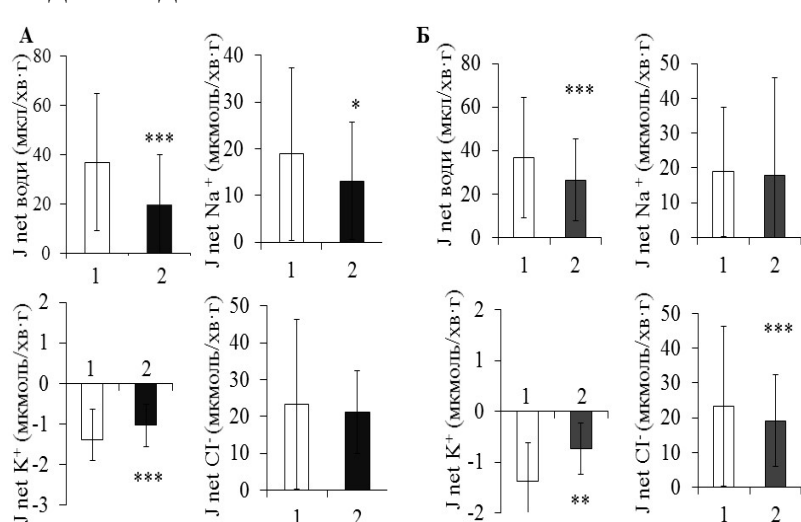


Рис. 2. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та СГ через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг ($n=14$) (А) та 300 мг/кг ($n=7$) (Б). 1 – вода; 2 – цефтріаксон. * $-p<0,05$; ** $-p<0,01$; *** $-p<0,001$, відносно контролю.

В клінічній практиці, при лікуванні важких інфекційних захворювань, наприклад, менінгіту [Amelieke J. H., 2014], збільшується тривалість курсу антибіотикотерапії з 5 до 14 днів. Введення цефтріаксону в дозі 50 мг/кг

зменшення числа тварин з діареєю до 6-7%. 50 мг/кг – це клінічна доза для цефтріаксону. Ми прийняли до уваги той факт, що при розрахунку еквівалентної дози препаратів враховується коефіцієнт відносної площі поверхні тіла, для щурів він дорівнює 6. Тому наступним етапом нашої роботи була перевірка впливу цефтріаксону в дозі 300 мг/кг на клінічні прояви діареї. Збільшення дози цефтріаксону до 300 мг/кг викликало діарею у більшого числа тварин, проте характер її перебігу був аналогічний до дози 50 мг/кг, що свідчить про транзиторий перебіг

ААД на тлі введення цефтріаксону. Далі ми перевірили наскільки клінічні прояви діареї пов'язані зі змінами у транспортній функції епітелію товстої кишки щурів за дії різних груп антибіотиків. Введення цефтріаксону впродовж 5 діб в дозі 50 мг/кг викликало зменшення всмоктування води на 47,5% ($p<0,001$), Na^+ на 28,8% ($p<0,05$), рівня секреції K^+ на 25,4 % ($p<0,001$). Рівень всмоктування СГ не змінювався (рис. 2А). Цефтріаксон в дозі 300 мг/кг призводив до зменшення сумарного рівня всмоктування води на 27,8% ($p<0,001$), СГ на 18,3% ($p<0,001$), секреції K^+ на 46,4% ($p<0,01$). Рівень всмоктування Na^+ не змінювався (рис. 2Б).

Таким чином, спостерігались односпрямовані ефекти між дозами 50 та 300 мг/кг на транспорт води, обидві дози викликали її зменшення.

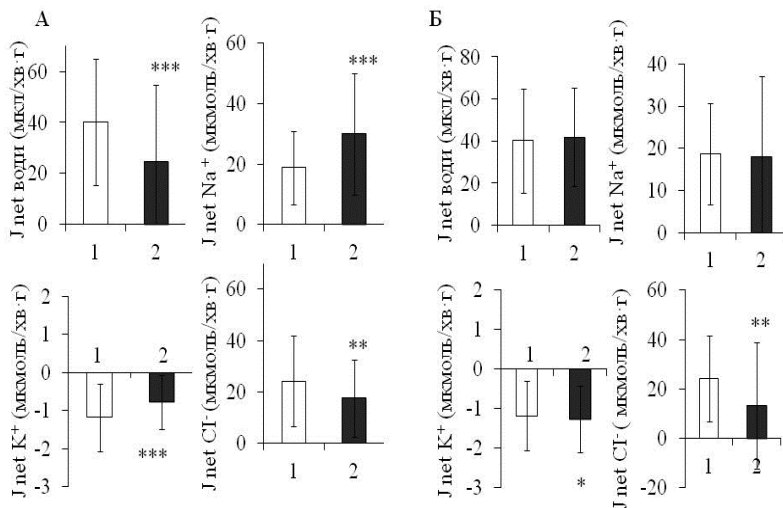


Рис. 3. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 14-добового введення цефтріаксону 50 мг/кг ($n=7$) (А) та 300 мг/кг ($n=5$) (Б). 1–вода; 2–цефтріаксон. *– $p<0,05$; **– $p<0,01$; ***– $p<0,001$ відносно контролю.

Na^+ статистично вірогідних змін у показниках не було (рис. 3Б).

Отже, отримані результати вказують на зміни у рівні сумарного току йонів хлору в залежності від збільшення тривалості введення антибіотику та підвищення його дози. Відомо, що збільшення секреції Cl^- через CFTR канали є ключовим механізмом секреторної діареї [Field M., 2003]. З іншого боку, секреція Cl^- необхідна для «вимивання» умовно-патогенної флори з поверхні кишечника та відновлення слизового бар'єру [Gareau M.G., Barrett K.E., 2013; Gustafsson J.K., 2013]. Нашими колегами було встановлено зрушення у складі пристінкової мікробіоти кишечника щурів, але не зафіксовано росту патогенної мікробіоти після введення цефтріаксону впродовж 5-14 днів, що свідчить на користь отриманих нами даних [Путников А.В., 2012].

Пероральне введення іншого антибіотику цефалоспоринового ряду цефіксиму не викликало діареї у щурів. При цьому спостерігалось навіть збільшення всмоктування води ($p<0,001$) та Cl^- ($p<0,001$). Сумарний потік K^+ вірогідно не змінювався, проте сумарний потік Na^+ знижувався ($p<0,001$) (рис. 4А). Пероральне введення макролідів азитроміцину також не викликало діареї у щурів. Проте, спостерігались значні зміни у показниках сумарного транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів (рис. 4Б). Так, всмоктування води збільшувалося на 145,2% ($p<0,001$), Na^+ на 75,4% ($p<0,001$) та Cl^- на 25,1% ($p<0,05$). Секреція K^+ зменшувалася на 6,3% ($p<0,05$).

Отже, ефекти викликані цефіксимом та азитроміцином, які на відміну від цефтріаксону вводили перорально, відрізняються від останнього. Це дозволяє припустити, що механізм ААД може залежати не лише від природи антибіотичної дії, але і від шляху введення антибіотику. На користь нашого

впродовж 14 діб зумовлювало вірогідне зниження рівня всмоктування води на 38,8% ($p<0,001$), Cl^- на 27,5% ($p<0,05$), секреції K^+ на 34,7% ($p<0,001$) та збільшення всмоктування Na^+ на 40,2% ($p<0,001$) (рис. 3А).

Введення щурам цефтріаксону в дозі 300 мг/кг впродовж 14 днів викликало зменшення сумарного потоку Cl^- на 44,1% ($p<0,01$) та незначне збільшення секреції K^+ на 6,8% ($p<0,05$). Щодо сумарного потоку води та

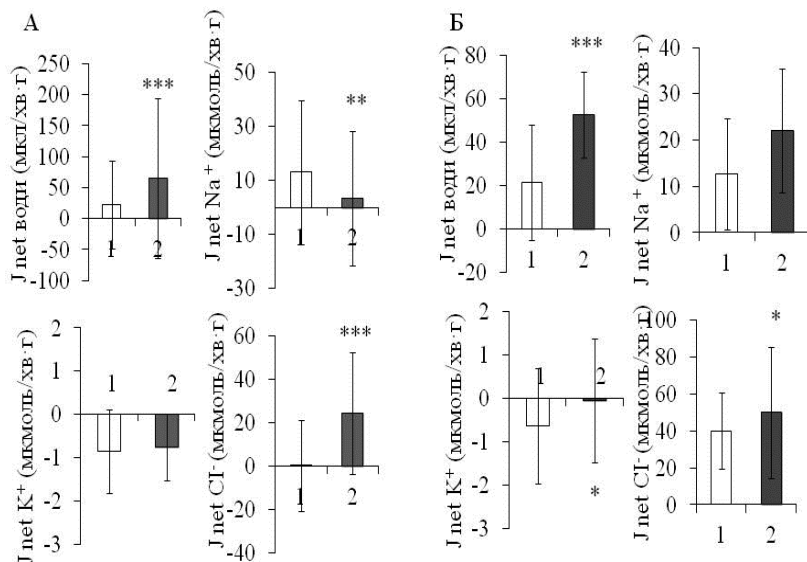


Рис. 4. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після введення антибіотику групи цефалоспоринів цефтріаксону (10 мг/кг, per os, $n=13$) (А) та групи макролідів азитроміцину (15 мг/кг, per os, $n=20$) (Б). 1 – вода; 2 – антибіотик. *– $p < 0,05$; **– $p < 0,01$; ***– $p < 0,001$ відносно контролю.

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

Механізми дії антибіотиків на транспортну функцію епітелію товстої кишки щурів. В наших дослідженнях 5-добове введення цефтріаксону викликало просекреторні зміни в епітелії товстої кишки. На молекулярному рівні це супроводжувалось зниженням експресії мРНК електрогенних натрієвих каналів ENaC/Scnn1b ($p < 0,05$), які відповідають за активне всмоктування йонів натрію; збільшенням експресії мРНК електрогенних хлорних каналів CFTR ($p < 0,001$), які обумовлюють секрецію хлору. Експресія мРНК електронейтрального Na^+/H^+ обмінника (NHE3/Slc9a3) не змінювалась (рис. 5).

Після 14-добового введення цефтріаксону відбувалось підвищення

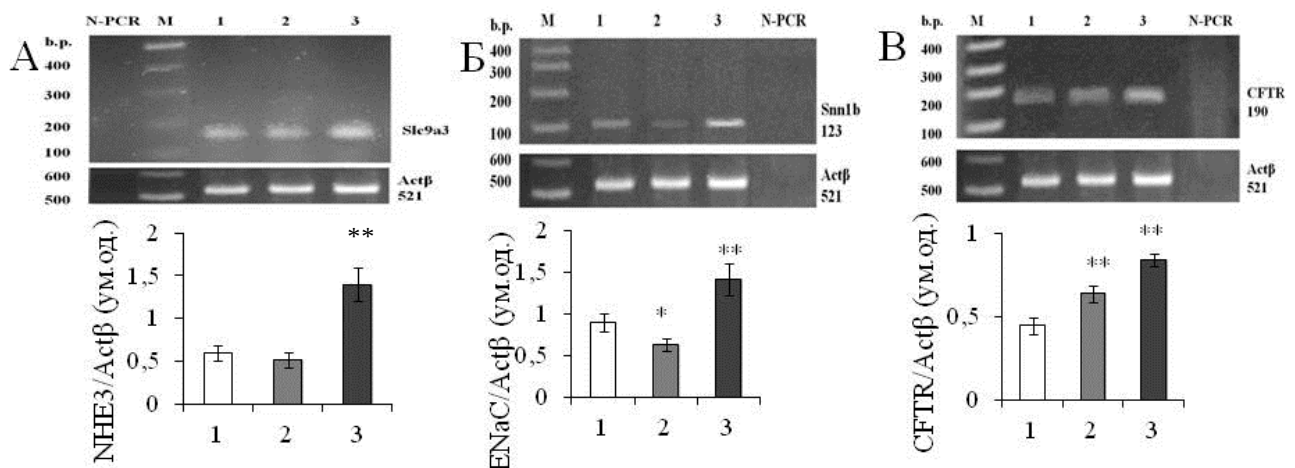


Рис. 5. Рівень експресії NHE3/Slc9a3 (А), ENaC/Scnn1b (Б) та CFTR (В) в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.). 1 – контроль ($n=5$); 2 – цефтріаксон 5 діб ($n=5$); 3 – цефтріаксон 14 діб ($n=5$). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ відносно показників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

всмоктування Na^+ , проте спостерігалась реверсія абсорбції на секрецію Cl^- (рис. 3А), що на молекулярному рівні супроводжувалось підвищенням експресії мРНК ENaC ($p < 0,01$) та Na^+/H^+ обмінника ($p < 0,001$). При цьому, спостерігалось збільшення експресії мРНК CFTR ($p < 0,001$), відносно показників після 5 діб (рис. 5)

Ми не спостерігали значних змін в експресії мРНК водного каналу AQP8. У зв'язку з тим, що рівень мРНК не завжди відображає рівень протеїнів, що кодується, ми перевірили відносну кількість протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів (рис. 6А). Введення цефтріаксону впродовж 5 діб не викликало змін у рівні протеїну AQP8, проте, після його 14-добового введення рівень AQP8 був зменшений в 3 рази ($p < 0,001$) (рис. 6Б).

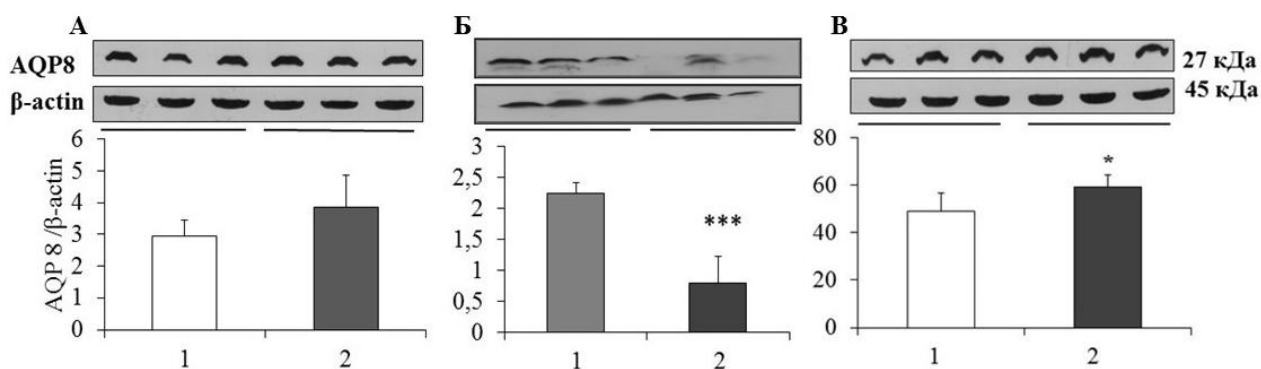


Рис. 6. Вестерн-блот аналіз рівня протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, після 5- (А) та 14-добового (Б) введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м., $n=5$) чи 5-добового введення азитроміцину (15 мг/кг, per os, $n=6$) (В). 1 – контроль 2 – антибіотик. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ відносно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

Слід підкреслити, що антибіотик азитроміцин, який, навпаки, підвищував всмоктування води через епітелій товстої кишки (рис. 4Б), зумовлював підвищення рівня протеїну AQP8 в 1,2 рази ($p < 0,05$) (рис. 6В).

Слизова оболонка товстої кишки покрита шаром слизу, який захищає епітелій від механічних пошкоджень та хімічних подразників [Johansson M.E., 2011]. Введення цефтріаксону впродовж 5 днів призводило до зменшення у 3 рази ($p < 0,01$) шару слизу на поверхні епітелію товстої кишки. Після 14-добового введення навпаки спостерігалось посилення секреції слизу і, відповідно, збільшення його рівня в 2,5 рази (рис. 7) ($p < 0,05$). Згідно літературних даних, динамічні зміни в рівні секреції та складі поверхневого слизу є частиною захисного механізму проти патогенної мікробіоти. Причому, цей ефект тісно пов'язаний зі змінами в транспорті води та електролітів [Gustafsson J.K., 2013; Tomas J., 2015]. Порушення слизового бар'єру сприяє контакту мікробіоти з епітелієм кишечника і може запускати прозапальну відповідь.

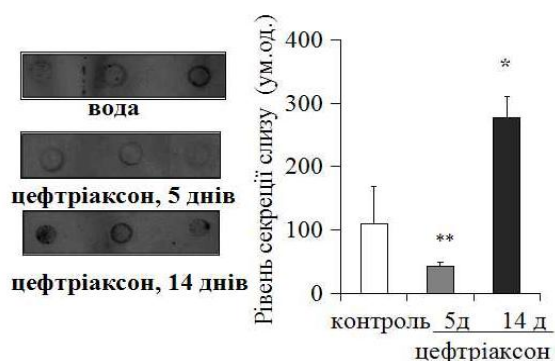


Рис. 7. Рівень секреції слизу в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5- та 14-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) ШИК-реакція на PVDF мембрані. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Відомо, що у пацієнтів на тлі антибіотиквикликаних дисбіотичних процесів, виникають прозапальні зміни в слизовій оболонці кишечника [Bringiotti R., 2014], які, в свою чергу, можуть призводити до розладу транспортної функції епітелію. Морфометричний аналіз гістологічних зразків товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону свідчить про виражений набряк і десквамацію епітелію та зменшення площі келихоподібних клітин (табл. 1), що характерно для процесу запалення.

Таблиця 1

Морфометричний аналіз слизової оболонки товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.)

Показники	Контроль	Цефтріаксон
Товщина слизової оболонки, мкм	138,03 ± 34,85	215,02 ± 34,85***
Глибина крипт, мкм	129,47 ± 18,5	179,42 ± 40,52***
Площа поперечного перерізу ядер ентероцитів, мкм ²	14,85 ± 4,85	20,52 ± 5,0***
Площа поперечного перерізу келихоподібних клітин, мкм ²	72,94 ± 31,62	62,08 ± 28,55*

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

Більш того, цитохімічний аналіз виявив зменшення в 2,4 раза ($p < 0,05$) кількості гранул тучних клітин (показник активації клітин) після введення цефтріаксону. Слід зазначити, що азитроміцин не викликав ніяких змін (рис.8).

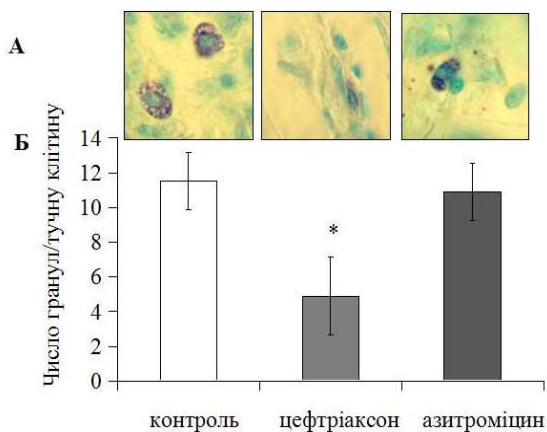


Рис. 8. Рівень дегрануляції тучних клітин після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м., $n=5$) та азитроміцину (15 мг/кг, per os, $n=5$). А – цитохімічне визначення тучних клітин толудіновим синім. Б – середнє значення кількості гранул на тучну клітину. * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

Основним медіатором тучних клітин є гістамін – потужний стимулятор секреції через епітелій товстої кишки [Xu J.D., 2012] та класичний медіатор гострого запалення. Тому, наступним етапом нашої роботи було дослідження ролі гістаміну та його залучення до цефтріаксонвикликаних зрушень у транспорті води та електролітів через епітелій товстої кишки.

Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки. Внутрішньовенне введення гістаміну в дозі 3,6 мг/кг*год викликало статистично значуще ($p < 0,05$) зменшення абсорбції води через епітелій товстої кишки щура, а в деяких випадках, навіть, реверсію абсорбції на секрецію. Ефект розвивався через 60 хв після початку інфузії гістаміну і тривав впродовж всього періоду експерименту. Також, спостерігалось вірогідне зниження всмоктування Na^+ та секреції K^+ вже через 40 хв від початку інфузії (рис. 9). Статистично вірогідних змін рівня всмоктування йонів Cl^- зареєстровано не було.

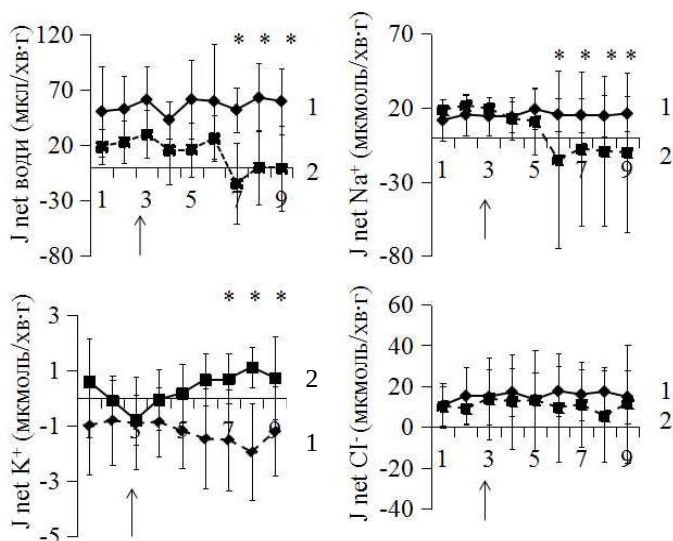


Рис. 9. Вплив гістаміну (3,6 мг/кг*год, в.в., $n=5$) на сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки. Стрілочками вказано початок введення води чи гістаміну. 1 – вода; 2 – гістамін. * – $p < 0,05$ відносно показників у контрольній групі.

За рівнем всмоктування води, Na^+ , K^+ ефект гістаміну співпадає з таким цефтріаксону, особливо, після його короткотривалого введення (рис. 2А), що може опосередковано свідчити про можливу участь гістаміну в механізмах розвитку діареї на фоні введення цефтріаксону.

У досліджах на ізольованих препаратах товстої кишки людини було показано, що саме H_1 , а не H_2 чи H_3 -гістамінові рецептори опосередковують просекреторну дію гістаміну на транспортну функцію епітелію [Keely S.J., 1995].

В нашій роботі сумісне введення блокатора H_1 -гістамінових рецепторів лоратадину знижувало відсоток тварин з цефтріаксонвикликанною діареєю з 6-12 % щурів до 2-4 %. Ці зміни супроводжувалися підвищенням сумарного потоку води на 95,2 % ($p < 0,01$) та секреції K^+ на 34,2 % ($p < 0,01$), порівняно з дією самого цефтріаксону, та не впливало на потік Na^+ та Cl^- (рис. 10).

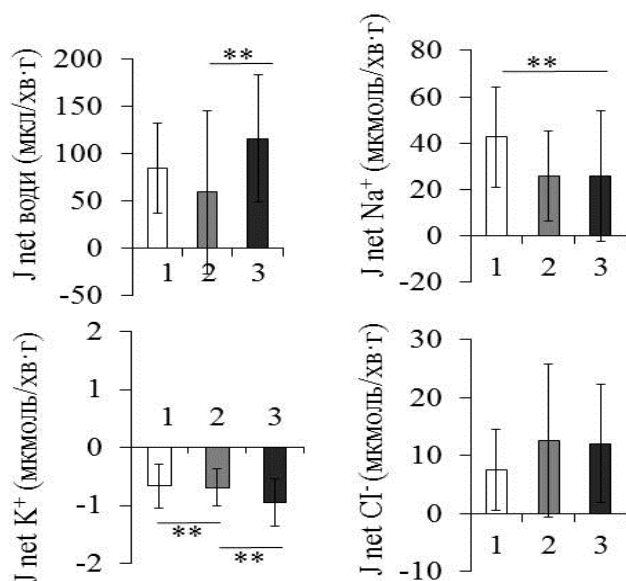


Рис. 10. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) та лоратадину (1,7 мг/кг, per os). 1 – лоратадин (n=3); 2 – цефтріаксон (n=5); 3 – цефтріаксон і лоратадин (n=5). ** – $p < 0,01$ відносно показників у контрольній групі.

Отже, при застосуванні антибіотиків може бути доречним призначення антигістамінних

препаратів не лише для запобігання алергічних реакцій, які часто супроводжують прийом антибіотиків, але й для попередження розвитку діареї.

Профілактична дія пробіотиків у попередженні порушень транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків. Для підтвердження ролі мікробіоти у розвитку прозапальних змін в епітелії товстої кишки, як фактору зрушень транспортної функції епітелію кишечника за умов ААД, ми дослідили ефекти пробіотичних препаратів. Введення мультипробіотику впродовж 5 діб призводило до зменшення всмоктування води на 65,6% ($p < 0,001$), Na^+ на 45,4% ($p < 0,001$), секреції K^+ на 60,9% ($p < 0,001$) порівняно з контрольною групою. Сумарний потік йону Cl^- залишався без змін (рис.11А). Тобто, мультипробіотик, сам по собі, спричиняв просекреторну дію на транспорт води та електролітів, аналогічно до дії антибіотику. При цьому, у тварин, яким впродовж 5 днів сумісно вводили цефтріаксон з мультипробіотиком, спостерігалось вірогідне збільшення рівня всмоктування води на 136,5% ($p < 0,001$) та Na^+ на 65,2% ($p < 0,05$). В сумарних потоках K^+ та Cl^- достовірних змін ми не спостерігали (рис. 11А).

Введення мультипробіотику впродовж 14 діб не викликало змін сумарного транспорту води через епітелій товстої кишки, але зменшувало рівень всмоктування Na^+ на 22,2% ($p < 0,05$), K^+ на 83,0% ($p < 0,001$) та збільшувало рівень всмоктування Cl^- на 124,4% ($p < 0,001$). Сумісне застосування цефтріаксону з мультипробіотиком впродовж 14 діб попереджало порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, викликане застосуванням антибіотику. Рівень всмоктування Na^+ та секреції K^+ були, навіть, вищими за контрольні, відповідно на 140,4% ($p < 0,01$) та 157,6% ($p < 0,001$). А рівень всмоктування Cl^- порівняно з контрольною групою знизився в 50 разів ($p < 0,001$) (рис. 11Б).

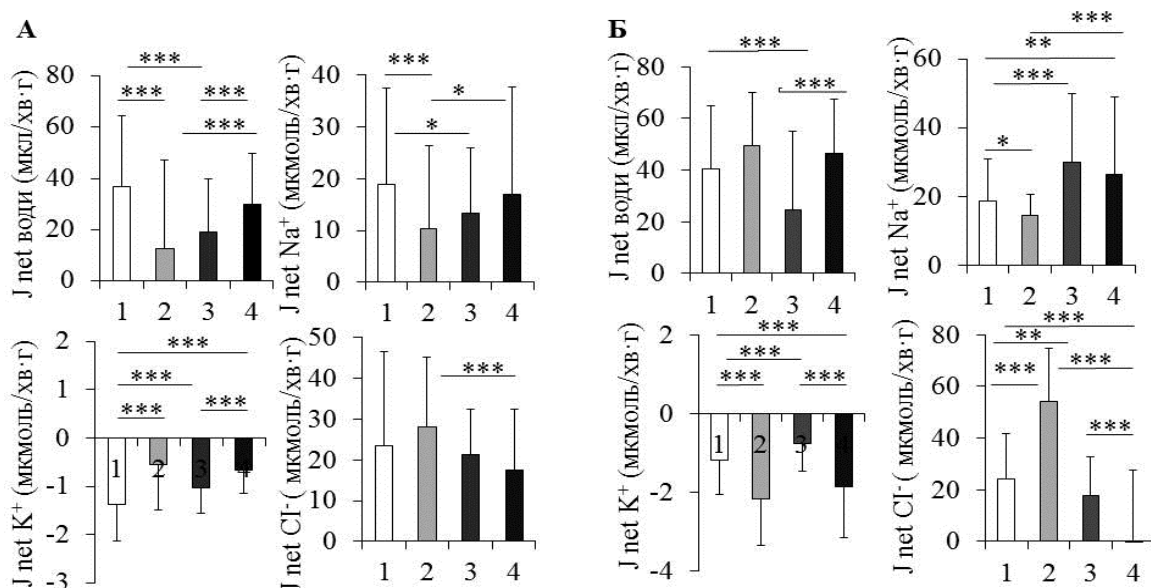


Рис. 11. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 5- (А) чи 14-добового (Б) введення цефтріаксону (50 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з мультипробіотиком ($1,6 \times 10^9$ КУО/кг, per os) 1 – вода (n=19); 2 – мультипробіотик (n=9); 3 – цефтріаксон (n=14); 4 – мультипробіотик+цефтріаксон (n=6). * – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

Далі ми перевірили ефект пробіотика небактеріальної природи *S. boulardii*, який має виражений антимікробний ефект [Pontier-Bres R., 2014]. Сумісне введення *S. boulardii* з цефтріаксоном впродовж 5 діб, попереджувало просекреторні ефекти антибіотику (рис. 12А). Таким чином, застосування *S. boulardii* та мультипробіотику на тлі введення цефтріаксону є обґрунтованим методом профілактики розвитку ААД.

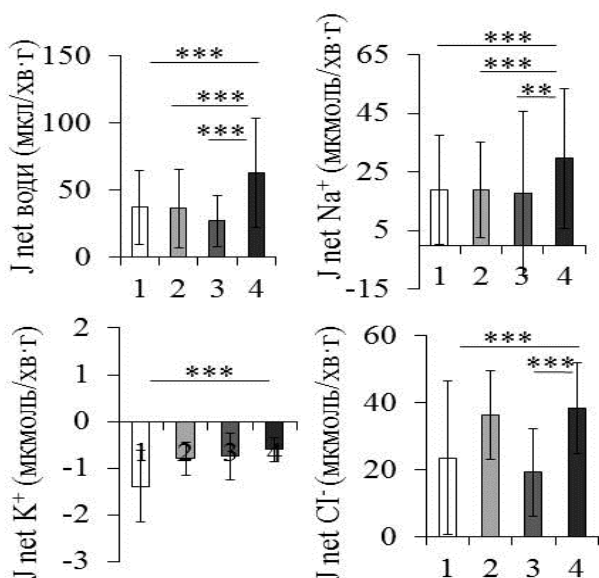


Рис. 12. Сумарний потік (J_{net}) води, Na^+ , K^+ та Cl^- через епітелій товстої кишки щурів після 5-добового введення цефтріаксону (300 мг/кг, в.м.) чи його комбінації з *S. boulardii* (10 мг/добу). 1 – вода (n=19); 2 – *S. boulardii* (n=7); 3 – цефтріаксон (n=7); 4 – цефтріаксон + *S. boulardii* (n=8). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ відносно показників у контрольній групі.

Узагальнюючи отримані дані, можна припустити, що початкові зрушення у балансі нормобіоти кишечника, будь-то в результаті 5-добового застосування антибіотиків чи пробіотиків бактеріальної природи, сприймається організмом як зсув у гомеостазі. Тому діарея виникає, як захисна реакція і,

можливо, має запальну природу, що супроводжується швидким вивільненням просекреторних медіаторів тучними клітинами, зокрема, гістаміну.

Інша ситуація після 14-добового введення, пробіотичні бактерії колонізують кишечник, і організм приходить до збалансованого співіснування з мікробіотою, тоді як антибіотик продовжує зрушувати цей баланс і навіть призводить до надмірного росту умовно-патогенних бактерій. Відповідно діарея через 14 днів це захисна реакція організму направлена на вимивання умовно-патогенних бактерій і зменшення їх контакту з епітеліальними клітинами слизової оболонки товстої кишки за рахунок збільшення секреції слизу.

ВИСНОВКИ

Вперше встановлено, що порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, як механізму антибіотикасоційованої діареї, характерно лише для певних груп антибіотиків, зокрема антибіотику цефалоспоринового ряду III покоління цефтріаксону.

1. Парентеральне введення антибіотику ряду цефалоспоринів цефтріаксону в дозі 50 мг/кг впродовж 5 діб викликало зменшення всмоктування води, яке напочатку було зумовлено зменшенням всмоктування натрію та секрецією калію. Зі збільшенням дози до 300 мг/кг та тривалості введення антибіотиків до 14 діб ці зміни асоціювалися зі збільшенням секреції хлору. Пероральне введення антибіотиків ряду цефалоспоринів цефіксиму (10 мг/кг) та ряду макролідів азитроміцину (15 мг/кг), навпаки, збільшувало всмоктування води, переважно за рахунок підвищеного всмоктування йонів хлору через епітелій товстої кишки щурів.

2. Введення цефтріаксону впродовж 5 діб не викликало достовірних змін у рівні протеїну AQP8, та мРНК NHE3, але зменшувало в 1,4-рази мРНК ENaC, та підвищувало в 1,4-рази – мРНК CFTR. Після введення цефтріаксону впродовж 14-ти діб зменшувався в 3-рази рівень протеїну AQP8 та підвищувалося в 2,4-рази мРНК NHE3, в 1,6-разів мРНК ENaC та в 1,9-разів – мРНК CFTR. Отже, порушення транспортної функції епітелію товстої кишки щурів за дії цефтріаксону, принаймі частково, зумовлені змінами в експресії транспортерів йонів Na^+ , Cl^- та аквапоринових каналів AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів.

3. Зміни у рівні секреції слизу в товстій кишці щурів за дії антибіотику цефтріаксону відповідають змінам у рівні секреції хлору. Після 5-добового введення цефтріаксону спостерігалось значне зниження, а після 14-добового введення, навпаки, збільшення секреції слизу.

4. 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 H_1 -гістамінових рецепторів лоратадином

попереджає клінічні прояви цефтріаксонвикликаної діареї, що супроводжувалось відновленням показників сумарного потоку води та калію через епітелій товстої кишки щурів.

5. На відміну від цефтріаксону, азитроміцин підвищує всмоктувальну здатність епітелію товстої кишки щурів, що супроводжується збільшенням рівня протеїну аквапоринових каналів AQP8 та характеризується відсутністю дегрануляції тучних клітин у стінці товстої кишки.

6. Комплексне застосування мультипробіотику (бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9) та пробіотику на основі *Saccharomyces boulardii* 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.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Довбинчук Т.В. Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотику цефтріаксону / Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2014. – Т. 3, №68. – С. 29-34. *(Здобувачем особисто проведена експериментальна робота, статистична обробка результатів та їх аналіз).*

2. Dovbynchuk T.V. The effect of multi-species probiotic on antibiotic-induced changes in colonic ion and water transport / T.V. Dovbynchuk, L.V. Zakordonets, V.N. Baban, T.N. Chervinska, G.N. Tolstanova // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 896-901. *(Здобувачем особисто проведено пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, експериментальну роботу, статистичну обробку результатів та їх аналіз).*

3. Довбинчук Т.В. Рівень транспортних протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки щурів після введення антибіотику цефтріаксона / А. Базан, Л.В. Закордонець, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2015. – Т. 2, №19. – С. 68-71. *(Здобувачем особисто проведено експериментальну роботу та підготовку матеріалів до друку).*

4. Довбинчук Т.В. Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за умов експериментального дизбіозу / Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець, А.В. Путніков [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2015. – Т. 61, 6. – С. 76-85. *(Здобувачем особисто проведено експериментальну роботу, статистичну обробку результатів та підготовку матеріалів до друку).*

5. Довбинчук Т.В. Роль гістаміну в механізмах антибіотиквикликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки / Т.В. Довбинчук,

Т.М. Червінська, Л.В. Закордонець, Г.М. Толстанова // Фізіологічний журнал. – 2016. - Т. 62, № 1. – С. 94-100. *(Здобувачем особисто проведено пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, експериментальну роботу та підготовку матеріалів до друку).*

6. Довбинчук Т.В. Современные подходы к лечению острой кишечной инфекции у детей / Л.В. Закордонец, С.А. Крамарев, Т.В. Береговая, А.Н. Толстанова, Т.В. Довбинчук // Здоровье ребёнка. – 2013. – Т. 48, №5. – С. 108-112. *(Здобувачем особисто проведено експериментальну роботу та статистичну обробку результатів).*

7. Довбинчук Т.В. Антибиотик-ассоциированная диарея: механизмы развития и возможности коррекции / Л.В. Закордонец, С.А. Крамарев, Т.В. Береговая, А.Н. Толстанова, Т.В. Довбинчук // Здоровье ребёнка. – 2013. – Т. 50, №7. – С. 108-112. *(Здобувачем особисто проведено експеримент, статистичну обробку отриманих результатів).*

8. Довбинчук Т.В. Профілактична дія мультипробіотика «Симбітер» на стан слизової оболонки товстої кишки та гепатоцитів за дії антибіотику цефтріаксону / О.П. Тяпко, Т.В. Довбинчук, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова // Збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (3-6 квітня 2012, Львів). – Львів, 2012. – С. 379-380.

9. Dovbynchuk T. The mechanism of ceftriaxone-induced abnormalities in colonic water and ion transport in vivo / G. Tolstanova, T. Dovbynchuk, O. Tyapko, L. Zakordonetz // Abstract book Basic Science Course “Epithelial ion transport in the GI tract” (12-15 July 2012, Szeged). – Szeged, Hungary, 2012. – P. 189.

10. Dovbynchuk T. Probiotic prophylactic measures and therapy antibiotic-associated changes fecal and parietal microflora of the rats colon / A. Putnikov, Y. Golota, T. Furzikova [et al.] // Abstract book II Scientific Conference of Young Physiologists “Physiology: from Molecules to the Body” (8-9 October 2012, Ukraine). – Україна, 2012. P. 41.

11. Dovbynchuk T. Dual action of multiprobiotic “Symbiter® acidophilic” on ceftriaxone-induced hepatic and colonic dysfunction / G. Tolstanova, T. Dovbynchuk, O. Tiapko [et al.] // 20th United European Gastroenterology Week (March 2012, Amsterdam). Amsterdam, Netherland, 2012: Gut. –2012 - Vol. 61. - №3. – P. A338.

12. Довбинчук Т.В. Механізм цефтріаксон-викликаного порушення транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів / Т.В. Довбинчук, О.П. Тяпко, О.В. Линчак, Г.М. Толстанова // Матеріали IX Міжнародної конференції студентів та аспірантів, приурочена до 150-річчя від дня народження академіка В.Вернадського «Молодь і поступ біології» (16-19 квітня 2013, Львів). – Львів, 2013. С. 411.

13. Dovbynchuk T. Effectiveness of multiprobiotic “Symbiter® acidophilus” to prevent antibiotic-induced hepatic and colonic dysfunction / T. Bereгова,

L. Zakordonets, T. Dovbynychuk [et al.] // Abstract book of the 7th International conference “Probiotics, prebiotics and new foods”. – Rome, Italy, 2013. - P. 145.

14. Довбинчук Т. Вплив мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» на цефтріаксон індуковані дисфункції печінки та товстої кишки / А.Ю. Кришук, Ю.В. Голота, А.В. Путніков [та ін.] // Міжнародна наукова конференція «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті» (10-11 квітня 2014, Київ). – Київ, 2014: Імунологія та алергологія. – 2014. – С. 64.

15. Dovbynychuk T. The colonic ion transport and mucus secretion during treatment with broad spectrum antibiotic ceftriaxone / T. Dovbynychuk, A. Dranitsina, T. Chervinska [et al.] // 8th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (24-26 September 2014, Budapest). - Budapest, Hungary, 2014: Dig Dis Sci - 2014. - Vol. 59, №8. – P. 1652-1653.

16. Довбинчук Т. Механізми порушення епітеліального бар'єру товстої кишки щурів за тривалої дії антибіотика цефтріаксону / А. Путніков, Т. Довбинчук, Ю. Голота [та ін.] // XI Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014, Київ). - Київ, 2014: The Ukrainian biochemical journal. – 2014. – Т. 86, № 5. – С. 28.

17. Довбинчук Т. Визначення активності ММР-2, мієлопероксидази (МПО) та рівня транспортних протеїнів AQP8 та CFTR в слизовій оболонці товстої кишки за умов тривалої антибіотикотерапії / А.С. Базан, Т.В. Довбинчук, Ю.В. Голота, Н.В. Дзюбенко, Т.М. Червінська // Bukovinian International Medical Congress (8-10 квітня 2015, Чернівці). - Чернівці. 2015: ХИСТ – 2015. - Вип. 17. - С. 56.

18. Довбинчук Т.В. Ефективність мультипробіотику для попередження антибіотик-викликаних порушень транспортної функції епітелію товстої кишки / Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець, В.М. Бабан [та ін.] // Матеріали науково-практичної конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (4-6 вересня 2015, Київ). - Київ, 2015. – С. 22.

АНОТАЦІЯ

Довбинчук Т.В. Механізм дії антибіотиків групи цефалоспоринів на транспорт води та електролітів через епітелій товстої кишки. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2016.

Дисертаційна робота присвячена вивченню механізмів порушення транспорту води та електролітів через епітелій товстої кишки щурів за дії антибіотиків та розробці методів їх корекції.

Отримані результати показали, що порушення транспортної функції епітелію товстої кишки, як механізму антибіотикасоційованої діареї (ААД), характерно лише для певних груп антибіотиків, зокрема антибіотику

цефалоспоринового ряду III покоління цефтріаксону. В основі діареї через 5 та 14 діб після введення цефтріаксону лежать різні механізми. Через 5 діб спостерігається збільшення дегрануляції тучних клітин, зменшення секреції слизу, зменшення сумарного потоку Na^+ , який є рушійною силою для всмоктування води. На молекулярному рівні ці зміни супроводжуються зменшенням експресії електрогенного Na^+ каналу (ENaC) та підвищенням - електрогенного Cl^- каналу (CFTR). Через 14 днів спостерігається протилежна картина: відновлюється синтетична здатність тучних клітин, збільшується секреція слизу, проте зменшується всмоктування Cl^- , що обумовлює зниження всмоктування води. На молекулярному рівні спостерігається зменшення експресії AQP8 та підвищення - електронейтрального обмінника Na^+/H^+ (NHE3), ENaC та CFTR. Гістамін справляє аналогічну до цефтріаксону (просекреторну) дію на транспорт води та Na^+ через епітелій товстої кишки щурів. Блокада H_1 -гістамінових рецепторів лоратадином попереджає клінічні прояви цефтріаксонвикликаної діареї. Комплексне застосування мультипробіотику (бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* і *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій з концентрацією живих клітин не менше 1×10^9) та пробіотику на основі *Saccharomyces boulardii* на фоні терапії цефтріаксоном попереджає просекреторні зміни в епітелії товстої кишки.

Ключові слова: антибіотикасоційована діарея, пробіотик, H_1 -гістамінові рецептори.

АННОТАЦІЯ

Довбинчук Т.В. Механизм действия антибиотиков группы цефалоспоринов на транспорт воды и электролитов через эпителий толстой кишки. - Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 - физиология человека и животных. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена изучению механизмов нарушения транспорта воды и электролитов через эпителий толстой кишки крыс при действии антибиотиков и разработке методов их коррекции.

Полученные результаты показали, что нарушения транспортной функции эпителия толстой кишки, как механизм антибиотикасоциированной диареи (ААД), характерна только для определенных групп антибиотиков, в частности антибиотика цефалоспоринового ряда III поколения цефтриаксона. В основе диареи через 5 и 14 суток после введения цефтриаксона лежат разные механизмы. Через 5 суток наблюдается увеличение дегрануляции тучных клеток, уменьшение секреции слизи, уменьшение суммарного потока Na^+ , который является движущей силой для всасывания воды. На молекулярном уровне эти изменения сопровождаются уменьшением экспрессии

электрогенного Na^+ канала (ENaC) и повышением – электрогенного Cl^- канала (CFTR). Через 14 дней наблюдается противоположная картина: восстанавливается синтетическая способность тучных клеток, увеличивается секреция слизи, однако уменьшается всасывание Cl^- , что обуславливает снижение всасывания воды. На молекулярном уровне наблюдается уменьшение экспрессии AQP8 и повышение – электронейтрального электрообменника Na^+/H^+ (NHE_3), ENaC и CFTR. Итак, через 5 суток диарея имеет противоспалительный характер связанный с выделением скорее всего провоспалительного медиатора гистамина из тучных клеток, а через 14 дней это защитная реакция нашего организма направленного на вымывание условно-патогенных бактерий и уменьшение их контакта с эпителиальными клетками слизистой оболочки толстой кишки и за счёт увеличения секреции слизи. Гистамин оказывает аналогичную цефтриаксону (просекреторное) действие на транспорт воды и Na^+ через эпителий толстой кишки крыс. Блокада H_1 -гистаминовых рецепторов лоратадином предупреждает клинические проявления цефтриаксонвызванной диареи. Комплексное применение мультипробиотика (бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Propionibacterium* и уксуснокислых бактерий с концентрацией живых клеток не менее 1×10^9) и пробиотика на основе *Saccharomyces boulardii* на фоне терапии цефтриаксоном предупреждает просекреторные изменения в эпителии толстой кишки.

Ключевые слова: антибиотикассоциированная диарея, пробиотик, H_1 -гистаминовые рецепторы.

ANNOTATION

Dovbynychuk T.V. The effect of cephalosporin antibiotics on net water and ion transport in colonic epithelium. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree by speciality 03.00.13 – physiology of human and animals. – Taras Shevchenko National University of Kyiv Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to the study of the mechanisms of net water and ion transport in rat colonic epithelium after antibiotic treatment and the development of prophylactic approaches.

We found that disturbance in net water and ion transport is the mechanism of antibiotic-associated diarrhea (AAD) of certain groups of antibiotics, e.g. the 3rd generation of cephalosporin ceftriaxone. The molecular mechanism of these changes differs after 5 days and 14 days of antibiotic therapy and might explain clinically observed transitory pattern of idiopathic AAD. Mast cells degranulation; decrease in mucus production; as well as decrease in sodium absorption via downregulation of ENaC expression; along with upregulation of CFTR channels in rat colon were associated with AAD after 5 days-therapy. After 14-days therapy, the increase of mucus production; mast cells granules restoration; as well as upregulation of CFTR

with decrease Cl⁻ absorption; along with increase sodium absorption via upregulation of ENaC and Na⁺/H⁺ exchanger expression; and decrease AQP8 protein levels might explain the decreasing number of animals with diarrhea at this time point. Histamine induced similar to ceftriaxone changes in water and Na⁺ absorption in rat colon. Antagonist of H₁-histamine receptors prevented ceftriaxone-induced diarrhea in rat. Combination of ceftriaxone with multiprobiotic (symbiosis of live cells: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*; acetic acid bacteria: 1.0x10⁹) or *Saccharomyces boulardii* probiotic prevented diarrhea and ceftriaxone-induced changes in colonic water and ion transport.

Keywords: antibiotic-associated diarrhea, probiotic, H1-histamine receptors.