

Транспорт води через епітелій товстої кишки щурів за умов експериментального дизбіозу

Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець¹, А.В. Путніков, І.М. Варенюк, О.П. Тяпко, Н.М. Рослова, Т.М. Сергійчук, О.В. Линчак, М.Е. Дзержинський, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; ¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ; e-mail: gtolstanova@gmail.com

Вивчено вплив 5-добового введення антибіотиків групи цефалоспоринів - цефтріаксону (50 мг/кг) та групи макролідів - азитроміцину (15 мг/кг) на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів-самців лінії Вістар (180-250 г) методом перфузії ізольованої ділянки in situ. Дія азитроміцину зумовлювала в 2,4 раза ($P < 0,001$) підвищення, а цефтріаксону в 1,9 раза ($P < 0,001$) зменшення всмоктування води. Ці зміни не були пов'язані зі зрушеннями в кількісному та якісному складі просвітної та пристінкової мікробіоти кишечника. Збільшення поглинання води за дії азитроміцину підвищувало експресію протеїну водного каналу - AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, тоді як зменшення всмоктування води за дії цефтріаксону не викликало змін, але супроводжувалося прозапальними процесами та дегрануляцією тучних клітин у слизовій оболонці товстої кишки щурів.
Ключові слова: товста кишка; цефтріаксон; азитроміцин; діарея; AQP8; тучні клітини.

ВСТУП

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 тиж після їх відміни. Частота розвитку такого стану становить 5 - 30% [1]. Згідно з сучасною теорією етіопатогенезу ААД, не більше ніж 20% випадків асоційовані з інфікуванням *Clostridium difficile* (*C. difficile*) [2]. Патогенез ідіопатичної ААД (не виявлений конкретний збудник діареї) може залежати від механізму антибактеріальної дії різних груп антибіотиків. Так, їх розвиток пов'язують з посиленням моторики кишечника (макроліди з 14-членим лактоним кільцем); підвищенням внутрішньопросвітнього осмотичного тиску за рахунок неповного всмоктування антибіотиків (цефоперазон, цефіксим); підвищенням активності секре-

торної функції кишечника у відповідь на порушення 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, цефалоспоринони, кліндаміцин тощо) [3]. Одним із механізмів діареї за дії різних груп лікарських препаратів є прямий вплив на всмоктувальну функцію епітелію кишечника, так бісакодил - чи мізопростволвикликана діарея зумовлені активацією аденілатциклази ентероцитів з наступною стимуляцією активної секреції Cl^- , HCO_3^- , пасивного відтоку Na^+ , K^+ та води. Блокада АТФази, дігосином, ауранофіном, колхіцином чи олсалазіном, викликає діарею через пригнічення активності Na^+ , K^+ -насосу [4]. Питання щодо змін у всмоктувальній функції товстої кишки в патогенезі ААД, з огляду на механізм дії різних груп антибіотиків, не досліджувалося, хоча існують поодинокі дані про прямий ефект антибіотиків на транспортну функцію епітелію [5].

© Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець¹, А.В. Путніков, І.М. Варенюк, О.П. Тяпко, Н.М. Рослова, Т.М. Сергійчук, О.В. Линчак, М.Е. Дзержинський, Т.В. Берегова, Г.М. Толстанова

Антибіотики широкого спектра дії ряду макролідів та цефалоспоринів є найбільш вживаними в клінічній практиці. Цефалоспорину властивий бактерицидний ефект, а макролідам – бактериостатичний [6]. Макроліди мають макроциклічне лактонне кільце (макролідне кільце), яке з'єднане з одним або кількома вуглеводневими залишками. Залежно від числа атомів вуглецю, які входять до складу лактонного кільця, макроліди поділяються на 12-, 14-, 15-, 16- та 17-членні. Препарати групи макролідів порушують синтез білка, що призводить до пригнічення розмноження і зниження вірулентності мікробних клітин, через зворотне зв'язування з каталітичним пептидил-трансферазним центром 50S-субодиниці рибосом [7].

Цефалоспорини – ряд природних і напівсинтетичних антибіотиків, які являють собою біциклічні з'єднання, що складаються з β -лактамних і дигідротіазинового кілець. Обидва кільця утворюють 7-аміноцефалоспоринову кислоту – загальне ядро молекули цефалоспоринів. Останні пригнічують синтез клітинної стінки бактерій, що викликає загибель бактерій внаслідок осмотичного лізису [8]. За даними літератури, при призначенні цефалоспоринів діарея виникає у 4 - 9 % випадків, а макролідів – 2 – 5 % [9].

Метою нашої роботи був порівняльний аналіз впливу азитроміцину (антибіотик групи макролідів з 15-членним лактоним кільцем) і цефтріаксону (антибіотик групи цефалоспоринів III покоління) на потік води через епітелій товстої кишки щурів.

МЕТОДИКИ

Дослідні тварини та схема експерименту. Дослідження проводили на 58 білих лабораторних щурах-самцях масою 180-250 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при сталій температурі та вологості повітря. Експерименти проводили згідно з етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики,

міжнародним угодам, національному законодавству у цій галузі [10] та біоетичною комісією ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварини були розподілені на 4 групи: I (n=12) і II (n=19) контрольні, яким вводили 1 мл і 0,1 мл води для ін'єкцій перорально і внутрішньом'язово відповідно; III дослідна група (n=13) – перорально отримували азитроміцин (“ПЛІВА” Хорватія) в дозі 15 мг/кг у вигляді водної суспензії з концентрацією діючої речовини 4 мг/мл; IV дослідна група (n=14) – щодобово внутрішньом'язово вводили цефтріаксон (“Артеріум”, ВАР “Київмедпрепарат”, Україна) в дозі 50 мг/кг протягом 5 діб. На 6-ту добу після початку експерименту (на початку експерименту вважали перший день введення антибіотика) у щурів визначали сумарний потік води через епітелій товстої кишки, методом перфузії ізольованої ділянки кишки *in situ*. Частину щурів, у яких не перфузували товсту кишку, збирали фекалії для мікробіологічного дослідження, після цього їх умертвляли за допомогою цервікальної дислокації, видаляли товсту кишку. Два сантиметра товстої кишки на відстані 3 см від анального отвору занурювали в 10 %-й формалін для гісто- та цитохімічного аналізу, 1 см кишки брали на мікробіологічний посів, з решти кишки зішкрябували слизову та занурювали в рідкий азот для подальших молекулярно-біологічних досліджень.

Здійснювали щодобовий моніторинг клінічних параметрів стану щурів: за масою тіла, млявістю (0-3 бали: 0 - норма, 1 – помірно піднята шерсть, 2 – тварина брудна, зменшення спонтанних рухів, 3 – тварина майже не рухається, не реагує на інших тварин), діареєю (визначали за м'якістю випорожнення).

Сумарний транспорт води через епітелій товстої кишки щурів досліджували методом перфузії ізольованої ділянки товстої кишки *in situ* [11]. Тварин наркотизували уретаном (“Sigma Chemical Co”, США), з розрахунку

1,15 г/кг (внутрішньоочеревинно). Сталу температуру тіла щурів (37°C) підтримували за допомогою грілки. Для попередження респіраторної недостатності виконували трахеотомію. Після цього відкривали черевну порожнину (лапаротомія), підтягували товсту кишку, накладали першу лігатуру на межі переходу сліпої у висхідну частину ободової кишки та робили надріз кишки і вводили привідний катетер для подачі перфузійного розчину. Через 8-10 см дистальніше від першої лігатури, накладали другу. Сегмент товстої кишки промивали теплим фізіологічним розчином та вводили вивідний катетер для збору відтікаючого (аспірованого) розчину, який фіксували другою лігатурою. Після цього закривали черевну порожнину. Привідний катетер під'єднували до багатоканального перистальтичного насоса ("Minipuls 3", Gilson®), який подавав перфузійний розчин (37°C) з постійною швидкістю 0,18-0,2 мл/хв. Як перфузійний розчин використовували модифікований ізотонічний розчин 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, до якого додавали неабсорбований маркер феноловий червоний (20 мг/л).

Після 60-хвилинної перфузії (еквілібраційний період) відтікаючий розчин збирали впродовж 180 хв, через кожні 20 хв. Результати, отримані за кожний період, усереднювали. В кінці експерименту щурів умертвляли введенням летальної дози наркозу. Сегмент кишки, що перфузували, швидко видаляли, розрізали його в повздовжньому напрямку, обережно промокали фільтрувальним папером та висушували в термостаті (60°C, 20 год), для отримання сухої маси в грамах.

Для розрахунку сумарного потоку (J_{net}) води визначали концентрацію неабсорбованого маркера фенолового червоного колориметричним аналізом на спектрофотометрі (Synergy HT BioTek), при трьох довжинах хвиль 520, 560, 600 нм для визначення поправки на неспецифічну абсорбцію [12].

Сумарний потік води вираховували за формулою:

$$J_{\text{net води}} = \frac{v \cdot \left(1 - \frac{C_n}{C_a}\right)}{W}, \text{ де}$$

$J_{\text{net води}}$ – сумарний потік води (мкл/хв·г);

v – швидкість подачі перфузату (мл/хв);

C_n і C_a – концентрація фенолового червоного в перфузійному і в аспірованому розчині відповідно;

W – суха маса сегменту кишки (г).

Позитивний результат свідчить про всмоктування, негативний – секрецію.

Імуноблотинг. Ізольовану ділянку товстої кишки подрібнювали за допомогою гомогенізатора "Dounce" ("Sigma", США) в лізуючому буфері (0,1% додецилсульфат натрію, 1% тритон x100, 2 мкмоль/л фенілметилсульфонілфлуорид, з додаванням коктейлю інгібіторів протеїназ 16,65 мл; ("Sigma", США) та фосфатаз (10 мкмоль/л ортованадат натрію; "Sigma", США). Концентрацію загального протеїну вимірювали за методом Бредфорд з використанням набору «Bio-Rad для білкового аналізу» ("Bio-Rad", США). Розділення та визначення вмісту протеїнів (100 мкг загального протеїну/зразок) методом імуноблотингу проводили в 12%-м содіум додецилсульфатному поліакріламідному гелі з наступним переносом на нітроцелюлозну мембрану "Hybond-ECL" ("Amersham Biosciences", США), згідно з стандартним протоколом фірми «Bio-Rad». Антитіла до AQP8 (1:500; "Sigma-Aldrich", Німеччина), використовували для визначення вмісту відповідних протеїнів, з наступною інкубацією з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрину (1:10000, "Santa-Cruz Biotech.", США). Візуалізацію імуноблоту проводили ентерохромофіноподібним реагентом (H₂O – 9 мл, тріс для 1М ентерохромофіноподібного-реагента – 10 мл, 68 ммоль кислоти кумарі – 225 мкл (-20 °C), 1,2 ммоль люмінол – 500 мкл (-20 °C) ("Amersham Biosciences", США). Результати, не менше двох різних експериментів, аналізували за допомогою програми Phoretix 1D.

Морфометричний аналіз гістологічних зрізів товстої кишки. Ділянки товстої кишки довжиною 2 см, які видаляли на відстані 3 см від анального отвору, фіксували у 10%-му формаліні, заливали у парафін за загальноприйнятою методикою, та виготовляли поперечні зрізи товщиною 5 мкм на роторному мікротомі (“Thermo Scientific™ HM 325 Rotary Microtome”). Зрізи забарвлювали гематоксилином з дофарбуванням еозином та аналізували під мікроскопом для виявлення морфологічних змін. Для морфометричного аналізу виготовляли цифрові мікрофотографії при збільшенні у 100 та 400 разів. Використовували мікроскоп *Olympus System Microscope Model BX41* та фотокамеру *Olympus Digital Camera C5050 Zoom* (Японія). За допомогою комп’ютерної програми *Image J* вимірювали товщину слизової оболонки, глибину крипт, висоту епітеліоцитів та площу поперечного перерізу їх ядер, площу поперечного перерізу келихоподібних клітин. Також підраховували кількість келихоподібних клітин.

Цитохімічне визначення тучних клітин. Зрізи товстої кишки забарвлювали за допомогою набору для цитохімічної ідентифікації тучних клітин толуїдиновим синім (ТОВ «БиоВитрум», Росія). Забарвлення проводили згідно з протоколом фірми-виробника. В тучних клітинах підраховували кількість гранул на одну клітину під імерсійним об’єктивом мікроскопа (“*Olympus System Microscope Model BX41*”). У кожній експериментальній групі було проаналізовано щонайменше 100 клітин.

Мікробіологічний аналіз вмісту кишечника. Для мікробіологічного аналізу збирали 1 г фекалій та ділянки слизової оболонки (1 см²) товстої кишки на відстані 2 см від анального отвору. Фекалії відбирали у пробірку з 9 мл фізіологічного розчину, після чого здійснювали поступове розведення з 10⁻¹ до 10⁻⁹ (фекальний біоптат). Ділянки товстої кишки тричі промивали від хімусу у фізіологічному розчині, після чого подрібнювали у гомогенізаторі Поттера та робили розведення з 10⁻¹ по 10⁻⁵ у фізіологічному розчині (при-

стінковий біоптат). Експериментально було адаптовано основні розведення для засіву на відповідні елективно-диференційні середовища (“HiMedia Laboratories Pvt.Ltd”, Індія). Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-метаболічними показниками. Вміст бактерій представляли як кількість колонієутворюючих одиниць на 1 г фекалій чи колоніє утворюючих одиниць на 1 см² пристінкового біоптату товстої кишки.

Статистична обробка результатів. Аналіз результатів проводили з використанням програми *Statistica 8.0*. Для кожної з вибірок перевіряли чи є нормальним розподіл досліджуваного показника, застосовуючи критерій Шапіро-Вілка. Для порівняння вибірок результатів сумарного потоку води використовували непараметричний метод – ранговий критерій груп U-тест Манна-Вітні. За умов нормального розподілу вибірок використовували критерій t Стьюдента. Середні значення сумарних потоків води представлені у вигляді медіани та процентиля [25;75], решта результатів – середнє значення ± стандартна помилка середнього (M±m). Статистично значущою для всіх показників вважали різницю P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

П’ятидобове введення азитроміцину не викликало значних змін у масі тіла та характері випорожнень щурів. Дослідження транспортної функції епітелію товстої кишки тварин на наступний день після останнього введення азитроміцину (6-ту добу експерименту) виявило збільшення всмоктування води в 2,4 раза (P<0,001). Так, сумарний потік води через епітелій товстої кишки в контрольній групі щурів становив 17,87 [9,74; 37,54] мкл/хв-г, а після введення азитроміцину – 47,67 [40,72; 59,14] мкл/хв-г (рис. 1).

Після ін’єкції цефтріаксону розвивалася діарея впродовж всього дослідного періоду. При цьому кількість тварин з рідким випо-

роженням пропорційно збільшувалася з подовженням терміну терапії: з 5% - на 2-й день до 11% - на 6-й день експерименту. Клінічні прояви діареї супроводжувалися зменшенням в 1,9 раза ($P < 0,001$) всмоктування води через епітелій товстої кишки, з 30,49 [16,33; 51,02] мкл/хв·г у контрольній групі до 15,73 [7,77; 30,46] мкл/хв·г у дослідній (див. рис. 1). Отже, азитроміцин та цефтріаксон мають різнонаправлений вплив на потік води через епітелій товстої кишки.

Вважається, що одним із механізмів розвитку діарейних явищ при антибіотикотерапії є порушення колонізаційної резистентності нормобіоти. Ми досліджували вплив введення азитроміцину та цефтріаксону на просвітну (фекальну) та пристінкову (як таку, що визначає цілістність епітеліального бар'єра) мікробіоту. Слід відмітити, що кількість облігатних цукролітичних біктерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* у обох біоптатах залишалась у межах норми. Підвищення кількості *Propionibacterium* при введенні азитроміцину в просвітному біоптаті (з $\lg 5,5 \pm 0,2$ до $\lg 8,0 \pm 0,9$ КУО/г, $P < 0,05$) та цефтріаксону у пристінковому біоптаті (з $\lg 5,7 \pm 0,4$ до $\lg 7,7 \pm 0,3$ КУО/г, $P < 0,05$) може розглядатись як компенсаторний механізм у забезпеченні трофічного та енергетичного живлення епі-

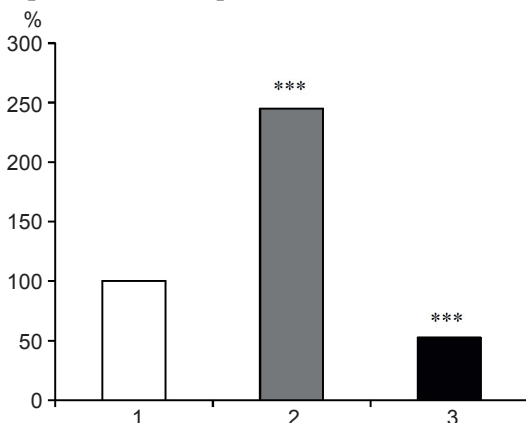


Рис.1. Сумарний потік води через епітелій товстої кишки щурів після 5- добового введення антибіотиків азитроміцину (15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово): 1 – контроль; 2 – азитроміцин; 3 – цефтріаксон.

*** $P < 0,001$ відносно показників у контрольній групі

теліоцитів. Збільшення числа представників роду *Clostridium* у пристінковому, при введенні азитроміцину, та фекальному біоптатах, при введенні цефтріаксону, можна розглядати з двох позицій: з одного боку вони відносяться до умовно-патогенної мікробіоти, а вид *C. difficile* вважається одним з факторів розвитку псевдомембранозного коліту [2]; з іншого боку – клостридії є найбільш активними продуцентами бутирату, який вважається найкращим енергетичним субстратом для клітин епітелію товстої кишки та відіграє суттєву роль в їх проліферації і диференціації [13]. Ми спостерігали підвищення кількості мікроорганізмів гемолітичної мікробіоти в фекаліях щурів після ін'єкції цефтріаксону (з $\lg 0 \pm 0$ до $\lg 5,0 \pm 0,2$ КУО/г, $P < 0,05$), при цьому на фоні азитроміцину цей показник становив $\lg 0 \pm 0$ КУО/г. У пристінковому біоптаті після терапії цефтріаксону чи азитроміцину не спостерігався ріст гемолітичної мікрофлори. Більше того, кількість інших умовно-патогенних мікроорганізмів залишалась у межах контрольних значень як у фекальному, так і пристінковому біоптатах. Ми припускаємо, що виявлена гемолітична мікрофлора є транзитornoю, і не може спричинювати стійку діарею. Таким чином, зміни всмоктувальної функції епітелію товстої кишки після терапії з азитроміцином чи цефтріаксоном не пов'язані з ростом умовно-патогенної мікрофлори.

Всмоктування води через епітелій товстої кишки відбувається двома шляхами: парацелюлярно (міжклітинний) та трансцелюлярно (за допомогою спеціальних, вбудованих в апікальну та базолатеральну мембрани каналів, що носять назву аквапорини – AQP) [14]. На сьогодні відомо 11 типів AQP-каналів, серед яких: 1, 3, 7, 10 та 11 експресуються в різних відділах травного тракту, тоді як AQP 8 є селективними для товстої кишки [15]. У дослідженнях на ізольованих колоноцитах показано, що блокада AQP 8-каналів маленькими інтерферуючими РНК значно пригнічує трансцелюлярний транспорт води

через апікальну мембрану поверхневих колоноцитів [16]. Зменшення їх експресії у слизовій оболонці товстої кишки пов'язані з розвитком діареї, викликаної інфільтрацією нейтрофілів на фоні терапії 5-флуороурацилом [17], за умов експериментальної харчової алергії у мишей [18], а також у пацієнтів з діареєю при синдромі подразненого кишечника [19]. Логічно припустити, що отримані зміни у потоці води можуть бути пов'язані з рівнем експресії AQP 8-каналів.

Нами було показано значну експресію протеїну AQP 8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів контрольної групи, що свідчить про визначну роль цих каналів в її функціонуванні. Щодобове введення щурам антибіотика групи макролідів азитроміцину зумовлювало підвищення експресії протеїну AQP 8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів у 10% (P<0,05;

рис. 2). На відміну від азитроміцину, для цефтріаксону не чинило статистично вірогідних змін у рівні експресії протеїну AQP8.

Відомо, що антибіотики ряду макролідів використовуються для лікування хронічної діареї, при цьому встановлено, що позитивний ефект був пов'язаний з антизапальною дією на епітелій кишечника [20]. Нами вперше встановлено, що азитроміцин підвищує рівень експресії AQP 8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, що супроводжувалося збільшенням всмоктування води і може бути додатковим фактором при призначенні антибіотиків цієї групи для лікування хронічної діареї. Описаний в літературі розвиток діареї на фоні терапії макролідами [9] не підтвердився в наших дослідженнях з азитроміцином. Ми припускаємо, що випадки діареї на фоні застосування макролідів пов'язані з їх проки-

Таблиця 1. Вплив азитроміцину (15 мг/кг, per os) та цефтріаксону (50 мг/кг, внутрішньом'язово) на мікробіоту товстої кишки щурів

Мікроорганізми	Азитроміцин				Цефтріаксон			
	Просвітна, lg КУО/г		Пристінкова, lg КУО/см ²		Просвітна, lg КУО/г		Пристінкова, lg КУО/см ²	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
<i>Bifidobacterium sp.</i>	8,6 ± 0,1	8,5 ± 0,5	5,7 ± 0,1	4,7 ± 0,9	8,7 ± 0,3	7,7 ± 0,8	5,3 ± 1,0	4,0 ± 0,3
<i>Lactobacillus sp.</i>	7,0 ± 0,4	6,7 ± 0,3	3,6 ± 0,4	4,0 ± 0,9	6,3 ± 0,4	5,0 ± 1,5	2,0 ± 0,9	2,4 ± 0,3
<i>Propionibacterium sp.</i>	5,5 ± 0,2	8,0 ± 0,9*	3,6 ± 0,1	4,5 ± 0,5	8,2 ± 0,9	7,1 ± 0,3	5,7 ± 0,4	7,7 ± 0,3*
<i>E.coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	6,8 ± 0,2	3,5 ± 1,5*	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,9	4,5 ± 0,5	2,1 ± 1,6*	1,7 ± 0,3	0 ± 0*
<i>E.coli</i> зі зниженими ферментативними властивостями	4,6 ± 0,4	4,6 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,5	4,7 ± 0,3	5,5 ± 0,4	0,7 ± 0,6	0 ± 0
Умовно-патогенні ентеробактерії	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	2,0 ± 0,2	4,0 ± 1,0*	1,4 ± 0,8	1,0 ± 0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,3 ± 0,6	3,8 ± 0,2	2,6 ± 0,3	0	3,5 ± 1,2	5,0 ± 0,8	0 ± 0	0 ± 0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,6 ± 0,3	6,0 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	4,5 ± 0,8	3,1 ± 1,2	0	0
<i>Clostridium sp.</i>	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,4	0	1,6 ± 0,1*	1,8 ± 0,6	4,1 ± 1,0*	0	0
<i>Candida sp</i> та інші гриби	0	0	0	0	1,8 ± 1,6	0	0	0
Гемолітична мікрофлора	2,8 ± 0,2	0	0	0	0	5,0 ± 0,2*	0	0

* P < 0,05 відносно значень у відповідній контрольній групі.

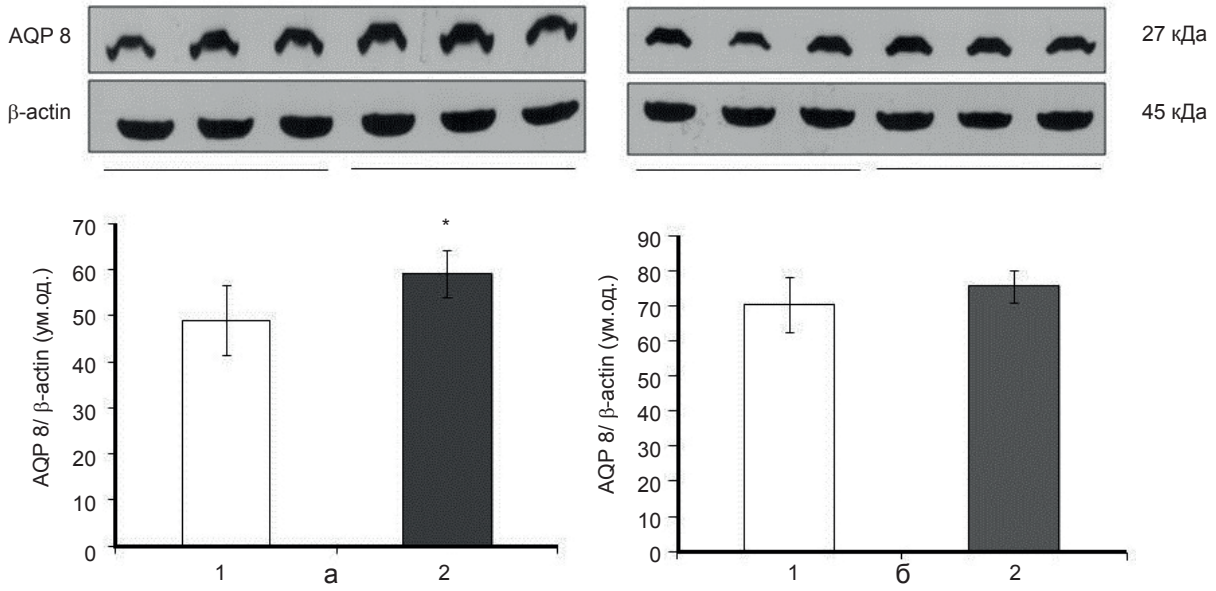


Рис. 2. Імуноблотинграма вмісту протеїну AQP8 в слизовій оболонці товстої кишки щурів після 5-добового введення антибіотиків азитроміцину (а; 15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксону (б; 50 мг/кг, внутрішньом'язово): 1 – контроль; 2 – дослід. * $P < 0,05$ відносно показників у контрольній групі

нетичною дією, яка описана для антибіотиків з 15-членним лактонним кільцем [21].

На відміну від антибіотиків ряду макролідів, які використовуються для зменшення запалення та лікування алергічних реакцій, антибіотики ряду цефалоспоринів можуть мати побічну дію у вигляді алергічної реакції, що пов'язано з активацією тучних клітин і розвитком запалення [22]. Збільшення числа тучних клітин у слизовій оболонці товстої кишки може супроводжуватися розвитком діареї. Це доведено як на експериментальних моделях [23], так і в клінічних спостереженнях. Показано, що блокатори H1-гістамінових рецепторів і стабілізатори мембрани тучних клітин зменшували прояви діареї [24]. Відомості щодо впливу цефалоспоринів на стан тучних клітин слизової оболонки товстої кишки, як один із причинних факторів розвитку діареї, відсутні.

У нашій роботі 5-добове введення цефтріаксону викликало значні прозапальні зміни у слизовій оболонці товстої кишки щурів. Спостерігався виражений набряк і десквамація епітелію. Дані морфометричного аналізу виявили впродовж збільшення в 1,6

раза товщини слизової оболонки ($P < 0,001$), в 1,4 раза – глибини кишкових крипт ($P < 0,001$) та площі поперечного перерізу ядер епітеліоцитів ($P < 0,001$). Також спостерігалось збільшення кількості келихоподібних клітин, але зменшення їх розміру (табл. 2).

Ми припустили, що прозапальні зміни за дії цефтріаксону і, пов'язана з ними діарея, є результатом активації тучних клітин слизової оболонки кишечника. Провели порівняльний аналіз рівня дегрануляції тучних клітин (показник активації клітин) після 5-добової терапії азитроміцином чи цефтріаксоном. Останій зумовлював зменшення кількості гранул тучних клітин в 2,4 раза ($P < 0,05$) порівнянно з контрольною групою тварин, тоді як азитроміцин не впливав на цей показник (рис. 3).

Отримані результати дозволяють припустити, що розвиток діареї за короткотривалої дії антибіотика групи цефалоспоринів цефтріаксону пов'язаний зі здатністю β-лактамних антибіотиків активувати тучні клітини [22]. Основним медіатором тучних клітин є гістамін, який є потужним стимулятором секреції через епітелій товстої кишки [25], що є підґрунтям

Таблиця 2. Морфометричний аналіз слизової оболонки товстої кишки щурів після 5-добової терапії цефтріаксоном (50 мг/кг, внутрішньом'язово)

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, мкм ²		
ядер ентероцитів,	14,85 ± 4,85	20,52 ± 5,0***
келихоподібних клітин	72,94 ± 31,62	62,08 ± 28,55*

* P <0,05; *** P<0,001 відносно значень у контрольній групі.

для подальшого тестування стабілізаторів тучних клітин чи антагоністів гістамінових рецепторів для запобігання розвитку діареї на фоні терапії цефалоспоринами.

ВИСНОВКИ

1. П'ятидобова терапія з антибіотиком групи макролідів азитроміцином чи групи цефалоспоринів цефтріаксоном викликала різнонаправлений ефект на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів. Азитроміцин зумовлював підвищення, а цефтріаксон зменшення всмоктування води.

2. Зміни в транспортній функції епітелію товстої кишки щурів після терапії з азитроміцином чи цефтріаксоном не були пов'язані зі змінами у кількісному та якісному складі просвітної та пристінкової мікробіоти.

3. Збільшення всмоктувальної здатності слизової оболонки товстої кишки щурів після

введення азитроміцину може бути пояснене підвищенням експресії протеїну AQP8, а зменшення після застосування цефтріаксону, може бути пояснене розвитком прозапальних змін та активацією тучних клітин в слизовій оболонці кишечника.

Робота була виконана за кошти гранта Президента України для обдарованої молоді «Розробка методів прогнозування та профілактики порушень в шлунково-кишковому тракті, викликаних антибактеріальною терапією» (договір № 12/2011) та бюджетної теми 01БФ-03601 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій».

Т.В. Довбинчук, Л.В. Закордонець, А.В. Путніков, І.М. Варенюк, А.П. Тяпко, Н.М. Рослова, Т.М. Сергійчук, О.В. Линчак, Н.Э. Дзержинський, Т.В. Береговая, А.Н. Толстанов

ТРАНСПОРТ ВОДИ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОЛСТОЇ КИШКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИЗБИОЗУ

Изучено влияние 5-дневного введения антибиотиков группы цефалоспоринов - цефтриаксона (50 мг/кг) и группы макролидов - азитромицина (15 мг/кг) на транспорт воды через эпителий толстой кишки крыс-самцов линии Вистар (180-250 г) методом перфузии изолированного участка кишки *in vivo*. Действие азитромицину вызывало в 2,4 раза усиление, а цефтриаксон в 1,9 раз уменьшение всасывания воды. Эти изменения не были связаны с нарушениями в количественном и качественном составе фекальной и пристеночной микрофлоры толстой кишки. Усиление всасывания воды на фоне введения азитромицина сопровождалось повышением экспрессии белка водных каналов – AQP 8 в слизистой оболочке толстой кишки крыс, тогда как уменьшение всасывания воды на фоне введения цефтриаксона не вызывало изменений но сопровождалось провоспалительными изменениями

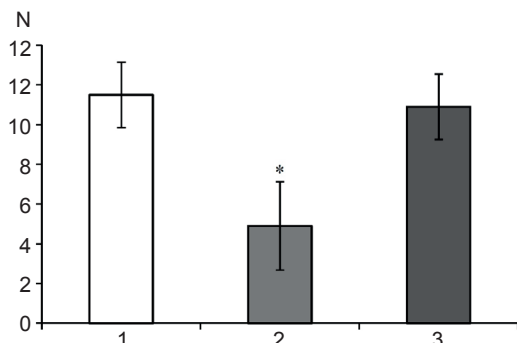


Рис.3. Рівень дегрануляції тучних клітин після 5-добової терапії азитроміцином (15 мг/кг, *per os*) та цефтріаксоном (50 мг/кг, внутрішньом'язово).

1 – контроль; 2 – цефтріаксон; 3 – азитроміцин. * P<0,05 відносно показників у контрольній групі

и дегрануляцией тучных клеток слизистой оболочки толстой кишки.

Ключевые слова: толстая кишка; цефтриаксон; азитромицин; диарея; AQP 8; тучные клетки.

T. Dovbynchuk, ¹L. Zakordonets, A. Putnikov, I. Vareniuk, O. Tiapko, N. Roslova, T. Sergiychuk, O. Lynchak, M. Dzerzhynsky, T. Beregova, G. Tolstanova

NET WATER TRANSPORT VIA RAT COLON EPITELIUM UNDER THE EXPERIMENTAL DYSBIOSIS

The aim of the present study was to investigate the effect of cephalosporin antibiotic ceftriaxone (50 mg/kg, i/m) and macrolide antibiotic azithromycin (15 mg/kg, per.os.) on net water transport across rat colonic epithelium. Study was done on male Wistar rats (180-250 g). Azithromycin or ceftriaxone was injected daily for 5 days. Net water transport was evaluated on the 6th day by isolated colonic loop perfusion technique in vivo on anaesthetized rats. Treatment with azithromycin increased 2,4-fold the absorption of water, while ceftriaxone caused decrease 1,9-fold water absorption. The antibiotics treatment within five days didn't change the composition of the fecal and colonic parietal microbiota. Azithromycin-induced increase in water absorption was associated with upregulation of AQP 8 water channel expression ($P < 0,05$) in colonic mucosa. Ceftriaxone treatment didn't change protein level of AQP 8 but induced pro-inflammatory changes in colonic mucosa structure and mast cells degranulation. We showed for the first time the opposite effects of macrolide and cephalosporin antibiotics on net water transport across rat colonic epithelium.

Key words: colon; ceftriaxone; azithromycin; diarrhea; AQP 8; mast cell.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv;

¹O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

REFERENCES

1. Beaugerie L, Flahault A, Barbut F. et al. Antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(7):905-12.
2. McFarland LV. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works. *J Med Microbiol.* 2005;54:101-11.
3. Kostyukevich OI. Antibiotic-associated diarrhea: myths and reality. *Rus J Med.* 2009;17(7):459-64. [Russian].
4. Ratnaik RN, Jones TE. Mechanisms of drug-induced diarrhoea in the elderly. *Drugs Aging.* 1998 Sep;13(3):245-53.
5. Goldhill JM, Rose K, Percy WH. Effects of antibiotics on epithelial ion transport in the rabbit distal colon in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48(6):651-6.
6. Alekhine EK. How do antibiotics. *Soros Educ J.* 2000;6(4). [Russian].
7. Veselov AV, Kozlov RS. Azithromycin: Modern Clinical aspects of application. *Klin microbiol antimicrobial himioter.* 2006;8(6):18-32. [Russian].
8. Koritnyuk RS, Vaytenko GM, Dultseva OV. The properties and rational application of antibiotics and sulfanilamide drugs. *Metodichni rekomendatsii.* – K., 2007. – 40c. [Ukrainian].
9. Kostyukevich OI. Antibiotic-associated diarrhea: myths and reality. *Health Ukraine.* 2010;18(247):56-57. [Ukrainian].
10. The first national congress on bioethics. *Ezhenedelnyk PHARMACY.* 2001;308(37) (from 24.09.2001). [Ukrainian].
11. Sladen GE, Harries JT. Studies on the effects of unconjugated dihydroxy bile salts on rat small intestinal function in vivo. *Biochem Biophys Acta.* 1972;288(2):P.443-56.
12. Schedl HP, White D. Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbable indicators for intestinal absorption studies in man. *Gut.* 1966;7(2):159-63.
13. Golovenko OV, Halyf IL, Golovenko AO. Role maslyanoy treatment of organic acids in functional diseases and colon. *Clinic. prospects gastroenterology, hepatology.* 2011;3:20-29. [Russian]
14. Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM. et al. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(3):647-63.
15. Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H. et al Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 1):C621-7.
16. Laforenza U, Cova E, Gastaldi G, Tritto S, Grazioli M, LaRusso NF. et al. Aquaporin-8 is involved in water transport in isolated superficial colonocytes from rat proximal colon. *J Nutr.* 2005;135(10):2329-36.
17. Sakai H, Sagara A, Matsumoto K, Jo A, Hirosaki A, Takase K. et al. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. *Pharmacol Res.* 2014;87:71-9.
18. Yamamoto T, Kuramoto H, Kadowaki M. Downregulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy. *Life Sci.* 2007;81(2):115-20.
19. Wang JP, Hou XH. Expression of aquaporin 8 in colonic epithelium with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Chin Med J.* 2007;120(4):313-6.
20. Blackwood RS, Tarara RP, Christie KL, Spinner A, Lerche NW. Effects of the macrolide drug tylosin on chronic diarrhea in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med.* 2008;58(1):81-7.
21. Costalos C, Gounaris A, Varhalama E, Kokori F, Alexiou N, Kolovou E. Erythromycin as a prokinetic agent in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(1):23-5.
22. Carson HJ, Cook BA. Mast cell tryptase in a case of anaphylaxis due to repeat antibiotic exposure. *Leg Med (Tokyo).* 2009;11(5):234-6.
23. Yamamoto T, Kodama T, Lee J, Utsunomiya N, Hayashi

- S, Sakamoto H. et al. Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. PLoS One. 2014 16; 9(1):e85888.
24. Baum CA, Bhatia P., Miner P.B. Jr. Increased colonic mucosal mast cells associated with severe watery diarrhea and microscopic colitis. Dig Dis Sci. 1989;34(9):1462-5.
25. Xu JD, Liu S, Wang W, Li LS, Li XF, Li Y et al. Emodin induces chloride secretion in rat distal colon through activation of mast cells and enteric neurons. Br J Pharmacol. 2012;165(1):197-207.

*Матеріал надійшов
до редакції 29.01.2015*