

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра фізіології людини та тварин

**Дипломна робота
Магістра**

на тему: **«Особливості всмоктування синтетичних органічних сполук у
шлунково-кишковому тракті білих мишей»**
«Peculiarities of absorption of synthetic organic compounds
in the gastrointestinal tract of white mice»

Виконала: студентка заочної форми навчання
Спеціальності 8.04010201 Біологія
Гусейнова Діана Елдарівна

Керівник: к.б.н., доц. Майкова Г. В. _____

Рецензент: к.б.н., доц. Зінченко О. Ю.

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ ___ від «___» _____ р.
Завідувач кафедри

_____ **Сьомік Л. І.**
(підпис) (прізвище, ініціали)

Захищено на засіданні ЕК № _____
Протокол № ___ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК

_____ **Філіпова Т. О.**
(підпис) (прізвище, ініціали)

Анотація

Досліджено фармакокінетичні параметри етанолу та оцтової кислоти в організмі білих мишей за умов їх внутрішньовенного та інтрагастрального введення.

Виявлено розподіл етанолу та оцтової кислоти в різних ділянках ШКТ за різних умов введення. Максимальне всмоктування оцтової кислоти при інтрагастральному введенні спостерігається в шлунку, а тонка, товста та пряма кишки можуть розглядатися, як «вікна всмоктування». Оцтова кислота у дозі 2 ммоль/кг всмоктується шляхом активного транспорту, у високих дозах (5 та 10 ммоль/кг) переважним є процес переносу за градієнтом концентрації. За умов внутрішньовенного введення оцтової кислоти спостерігається її реабсорбція у ШКТ. Одночасне інтрагастральне введення у зростаючих дозах (5, 10, 20 ммоль/кг) етанолу та внутрішньовенне введення ^{14}C -етанолу призводило до зменшення його концентрації залежно від дози у різних ділянках ШКТ, що свідчить про те, що транспорт етанолу відбувається шляхом дифузії.

Роботу викладено на 49 сторінках, вона містить 20 рисунків. Наведено посилання на 43 джерела літератури (13 кирилицею та 30 латиницею).

Ключові слова: ^{14}C -етанол, ^{14}C -оцтова кислота, ШКТ.

The pharmacokinetics of ethanol and acetic acid in the body of white mice under the conditions of its intravenous and intragastric administration was studied.

The distribution of ethanol and acetic acid in different parts of the gastrointestinal tract under various conditions of administration has been revealed. The maximum absorption of acetic acid with intragastric administration is observed in the stomach, and the thin, thick intestine and rectum can be considered as "suction windows". Acetic acid at a dose of 2 mmol / kg is absorbed by active transport, in high doses (5 and 10 mmol / kg), the concentration gradient transfer process is preferred. Under the conditions of the introduction of acetic acid, it is reabsorbed into the digestive tract. Simultaneous intracanal injection of ethanol in the increasing doses (5, 10, 20 mmol / kg) and intravenous administration of ^{14}C -ethanol led to a decrease in its concentration depending on the dose in various parts of the gastrointestinal tract, which indicates that ethanol is transported by diffusion. Diploma thesis is presented on 49 pages, it contains 20 figures. It provides links to 43 references (13 cyrillic and 30 latinic).

Key words: ^{14}C -ethanol, ^{14}C - acetic acid, gastrointestinal tract.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДГ	Алкогольдегідрогеназа
АЛДГ	Альдегіддегідрогеназа
АТФ	Аденозинтрифосфат
КЛЖК	коротколанцюжкові жирні кислоти
МСОЕ	мікросомальна система, що окислює етанол
ШКТ	шлунково-кишковий тракт
NAD	Нікотинаденіндинуклеотид

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Фізіологічні аспекти всмоктування.....	8
1.2. Утворення коротколанцюжкових жирних кислот в організмі людини та тварин.....	9
1.2.1. Утворення з некрохмальних вуглеводнів.....	9
1.2.2. Утворення КЛЖК із екзогенних сполук.....	10
1.2.3. Утворення КЛЖК в результаті метаболізму лікарських засобів .	12
1.2.4. Утворення КЛЖК внаслідок метаболізму природних сполук	13
1.3. Біологічні властивості КЛЖК та їх вміст в ШКТ та крові	14
1.3.1. Біологічні властивості КЛЖК.....	14
1.3.2. Вміст КЛЖК у ШКТ та крові	19
1.4. Фармакодинамічні властивості етилового спирту	20
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	23
2.1. Дослідні тварини, обладнання та реактиви	23
2.2. Методика дослідження фармакокінетики оцтової кислоти.....	24
2.3. Методика дослідження фармакокінетики етилового спирту	24
2.4. Методика пробовідбору зразків біологічного матеріалу.....	25
2.5. Статистична обробка результатів.....	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1. Транзит та всмоктування оцтової кислоти в організмі білих мишей.....	26
3.2. Кишково-печінкова циркуляція та реабсорбція оцтової кислоти.....	31
3.3. Міжклітинне всмоктування та реабсорбція етилового спирту в шлунково-кишковому тракті мишей	35
УЗАГАЛЬНЕННЯ	42
ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	46

ВСТУП

Коротколанцюжковим жирним кислотам (КЛЖК) приділяється значна увага як регуляторам низки фізіологічних процесів. Зазначені кислоти приймають значну участь у багатьох біохімічних процесах в кишечнику, головними з яких є підтримання водно-електролітного балансу, регуляція катаболічних процесів, модуляція репаративних процесів та навіть регуляція й гальмування новоутворень. Разом із КЛЖК всмоктуються іони калію, натрію, хлору та води. Процес всмоктування кислот впливає на вміст карбонатів та значення рН кишечника, також вони слугують важливим чинником у підтриманні балансу мікробної системи в кишечнику [5].

У КЛЖК знайдено ще низку інших ефектів, таких як підтримання детоксикаційної функції печінки, участь в кишково-печінковій циркуляції жовчних кислот, регенерації моторики гладкої мускулатури кишечника та мезінтеральних судин. Вони мають відповідний вплив на експресію різних генів у колоноцитах та змінюють рівень деяких гормонів гіпофізу. В останній час все більше з'являється даних про те, що ці кислоти мають антинеопластичну, противірусну (відносно герпесу і цитомегаловирусу) дію та є модуляторами діяльності імунної системи [27, 29].

Враховуючи той факт, що зазначені фізіологічні процеси мають місце в кишечнику, особлива увага дослідників зосереджена на процесах всмоктування КЛЖК з його відповідних відділів.

Екзогенним метаболічним попередником оцтової кислоти є етанол (етанол \rightarrow ацетальдегід \rightarrow оцтова кислота), дослідження фармакокінетики даних сполук дає можливість передбачити внесок кожної речовини в загальний масоперенос КЛЖК.

Деяка токсична та фармакологічна дія етанолу пов'язана з його метаболітами, насамперед ацетальдегідом. Відомі [18] токсичні ефекти ацетальдегіду, що реалізуються на різних рівнях: поведінковому (аверсія), фізіологічному (абстиненція), біохімічному (накопичення токсичних

альдегідів, утворення продуктів з амінокислотами, білками та катехоламінами), морфологічному (хроматоліз базофільної речовини, дистрофічна зміна клітин глії і т. ін.). Окрім того, етанол є фармакологічним агентом, що проявляє анксиолітичну, седативну та протисудомну дії [42]. З іншого боку, надлишкове утворення у процесі його метаболізму ацетату призводить до метаболічного ацидозу та зсуву кислотно-лужного балансу до позафізіологічних меж.

Метаболізм етанолу має місце в основному в печінці [40]. На першому етапі він перетворюється в ацетальдегід (оцтовий альдегід). На другому етапі ацетальдегід окислюється до оцтової кислоти за допомогою НАД-залежної альдегіддегідрогенази [30]. Більш того, такі фармакокінетичні дослідження є актуальними так як відомо, що КЛЖК є синтонами низки різних класів лікарських засобів (аспірин, ацетат кальцію, левометадин, фенobarбітал, леуковарін, вальпроєва кислота, саліцилова кислота). Тому в процесі метаболізму деякі з них можуть утворювати ці кислоти і тим самим впливати на процес життєдіяльності клітин.

Останнім часом висловлено припущення, що ефект первинного проходження має місце і в тому випадку, коли етанол окиснюється в шлунково-кишковому тракті. Однак питання про співвідношення між концентраціями етанолу в плазмі крові при обох шляхах введення та залежність його від ефекту первинного проходження, викликаного ферментами печінки і шлунково-кишкового тракту, висвітлено в науковій літературі недостатньо.

Мета роботи –дослідити всмоктування у шлунково-кишковому тракті білих мишей оцтової кислоти та етанолу за умов інтрагастрального та внутрішньовенного введення

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні задачі:

1. Визначити ділянки ШКТ, в яких відбувається всмоктування та абсорбція оцтової кислоти за умов її інтрагастрального введення білим мишам у дозах 2, 5, 10 ммоль/кг.

2. Визначити ділянки ШКТ, в яких відбувається всмоктування та абсорбція оцтової кислоти за умов її внутрішньовенного введення білим мишам у дозі 2 ммоль/кг.

3. Дослідити ділянки ШКТ, в яких відбувається всмоктування та абсорбція етанолу за умов попереднього інтрагастрального введення у зростаючих дозах та внутрішньовенного введення у дозі 5 ммоль/кг білим мишам.

Об'єкт дослідження: фармакокінетика КЛЖК та механізми транспорту ксенобіотиків в шлунково-кишковому тракті.

Предмет дослідження: концентрація оцтової кислоти та етилового спирту в ШКТ.

Щиро вдячна д.б.н., старшому науковому співробітнику відділу фізико-хімічної фармакології Фізико-хімічного інституту імені О.В. Богатського НАН України Ларіонову Віталію Борисовичу за допомогу у виконанні дипломної роботи

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Доведено, що всмоктування кислот є складним процесом, що охоплює низку чинників та механізмів, більшість з яких до сьогодні не з'ясовано. В той же час вони свідчать про те, що всмоктування в кишечнику має місце в його товстій частині і охоплює як міжклітинний, так і крізьклітинний транспорт. З огляду на це, потребують вивчення деякі питання, що стосуються механізмів їх транспорту в ШКТ, які відповідають за біодоступність сполук.

Метаболічні перетворення речовин в організмі можливі завдяки фундаментальним властивостям молекул, які відображаються в їх реакційній здатності. Вони можуть відбуватись з різною швидкістю, бути внутрішньо молекулярними або відбуватись за допомогою інших речовин. В багатьох випадках утворюються проміжні реакційноздатні активні метаболіти, які в подальшому стають причиною прояву різних видів токсичності, канцерогенезу, мутагенезу, тератогенезу та алергійних реакцій.

Деякі з питань всмоктування, кишково-печінкова циркуляція, реабсорбція визначали мету наших досліджень. При цьому основна увага дослідження була зосереджена на фармакокінетичних особливостях оцтової кислоти, що безпосередньо була введена експериментальним тваринам. Це дало можливість визначити відповідні параметри зазначених процесів. З іншого боку, викликає значний інтерес фармакокінетика екзогенного метаболітного попередника оцтової кислоти – етанолу.

Дослідження всмоктування оцтової кислоти показало наявність другого піку концентрації в товстій та прямій кишках, що свідчить про повторне всмоктування оцтової кислоти. З метою підтвердження цього припущення було проведено дослідження його транспорту вздовж ШКТ. При інтрагастральному введенні ^{14}C -оцтової кислоти відмічено дозозалежний вміст радіоактивного матеріалу в окремих ділянках ШКТ. Показано, що окрім тонкої кишки, товсту та пряму кишки можливо віднести до

альтернативних вікон всмоктування ацетату. Також доведена можливість реабсорбції у відповідних умовах. Зазначимо, що процес реабсорбції ацетату залежить від багатьох факторів, таких як ступінь зв'язування з білками сироватки крові, об'єму розподілу, ліпофільності, рКа, молекулярного розміру молекули і інтенсивності потоку крові в судинах травного каналу. Не виключена можливість, що значний вміст радіоактивного матеріалу в кишечнику мишей є наслідком його секреції із жовчу у просвіт кишок, тобто сполука приймає участь в «кишково-печінковій» циркуляції. Визначено, що всмоктування ацетату здійснюється крізьклітинним шляхом, а також за допомогою специфічного переносника.

Етанол є метаболітним попередником оцтової кислоти (через проміжний метаболіт – ацетальдегід) і представляє інтерес як самостійний лікарський засіб з низкою фармакодинамічних властивостей. Експериментальним шляхом було встановлено, що основними місцями всмоктування етилового спирту є шлунок та тонка кишка.

Показано, що етанол спроможний до міжклітинного транспорту і це сприяє не тільки процесу всмоктування, але і реабсорбції, тобто повернення у відповідні тканини ШКТ (при внутрішньовенному введенні). Останнє в нормі може мати місце тільки в тому випадку, коли порушується процес елімінації сполуки або її метаболітів з крові, що призводить до зміни їх градієнта концентрації в системі ШКТ – кров.

Таким чином, одержані результати свідчать про можливість всмоктування оцтової кислоти(ацетату) та його метаболітних попередників у тонкій, товстій та прямій кишках, що обумовлено їх реабсорбцією, за наявності градієнта концентрації у системі кровотік – ШКТ.

Всмоктування етанолу здійснюється міжклітинним шляхом простою дифузією, а оцтової кислоти крізьклітинним за допомогою неспецифічного переносника. Кишково-печінкова циркуляція етанолу та його метаболітів якщо і існує в організмі мишей, але вона не є визначальною в процесі їх транспорту з крові в ШКТ.

ВИСНОВКИ

1. Визначено, що при інтрагастральному введенні у дозах 2, 5 та 10 ммоль/кг оцтова кислота максимально всмоктується у шлунку, а тонка, товста та пряма кишки можуть бути віднесені до «вікон всмоктування».
2. Виявлена реабсорбція оцтової кислоти у нижчих відділах ШКТ за умов її внутрішньовенного введення у дозі 2 ммоль/кг.
3. Виявлено дозозалежне зниження концентрації етанолу у різних ділянках ШКТ за одночасного інтрагастрального введення зростаючих доз етанолу та внутрішньовенного введення ^{14}C -етанолу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Белобородова Н. В., Белобородов С. М.* Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма // Антибиотикотерапия и химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 28 – 36.
2. *Белоусова Е. А., Морозова Н. А.* Возможности лактулозы в коррекции нарушений кишечной микрофлоры // Фарматека. – 2005. – Т. 97, № 1. – С. 1–5.
3. *Бондаренко В. М., Грачева Н. М.* Пробиотики, пребиотики и симбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56 – 63.
4. *Головенко Н. Я.* Физико-химическая фармакология. – Одесса : Астропринт, 2004. – 720 с.
5. *Головенко М. Я., Борисюк І. Ю.* Концепція «вікно всмоктування» в загальній фармацевтичній стратегії // Вісник фармакології та фармацевції. – 2008. – № 3. – С. 43 – 49.
6. *Головенко Н. Я., Борисюк І. Ю.* Теоретические основы биофармацевтической классификационной системы // Фармаком. – 2007. – № 3. – С. 27 – 37.
7. *Ларіонов В. Б.* Співвідношення концентрацій етанолу у головному мозку та плазмі крові при його внутрішньовеному та інтрагастральному введенні мишам // Досягнення біології та медицини. – 2007. – Т. 10, № 2. – С. 42 – 46.
8. *В.Б., Овчаренко Н.В., Борисюк І.Ю., Лихота Е.Б.* Транспорт ¹⁴C-ацетата и его метаболитов через гистогематические барьеры нервной и пищеварительной систем белых мышей// Досягнення біології та медицини. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 45 – 48.
9. *Ларіонов В. Б., Федорова О. А., Головенко М. Я.* Аналіз проникності гематоенцефалічного бар'єра для нижчих аліфатичних спиртів на основі

- фармакодинамічних і нейротоксичних ефектів // Фармакологія та лікарська токсикологія.–2013. – Т35. – № 4–5. – С. 19-30.
10. *Калюжная Л. Д., Милорава Т. Т., Турик Н. В., Уваренко Е. А.* Новый пребиотик в комплексной терапии атопического дерматита у детей // Мистецтво лікування. – 2006. – № 12. – С. 32 – 33.
11. *Коваленко В. Н., Викторов А. П., Мальцев В. И.* Компендиум 2006 – лекарственные препараты. – К.: Морион, 2006. – Т. 1. – 1128 с. – Т. 2. – 1126 с.
12. *Стефанов О. В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. – Київ. : МОЗ України. Державний фармакологічний центр. – 2001. – 527 с.
13. *Холодов Л.Е., Дорохов В.В.* Автоматизированная система программ индивидуального дозирования (АСПИД) для расчета фармакокинетических параметров и анализа связи между концентрацией и фармакологическим эффектом // Фармакол. и токсикол. – 1985. – 48, № 4. – С. 65–69.
14. *Akanj A. O., Humphreys S., Thursfield V.* The relationship of plasma acetate with glucose and other blood intermediary metabolites in non–diabetic and diabetic subjects // Clin. Chim. Acta. – 1989. – V. 185. – P. 25 – 34.
15. *Allison C., Macfarlane G. T.* Effect of nitrate on methane production and fermentation by slurries of human faecal bacteria // Journal of General Microbiology. – 1988. – V. 134, N 6 – P. 1397 – 1405.
16. *Barnard J. A.* Short chain fatty acid regulation of intestinal gene expression // Adv. Exp. Med. Biol. – 1997. – V. 422. – P. 137 – 144.
17. *Botta G. A., Arzese A., Minisini R., Trani G.* Role of structural and extracellular virulence factors in gram–negative anaerobic bacteria // Clin. Infect. Dis. – 1994. – V. 18, N 4. – P. 260 – 264.
18. *Bridges S. R., Anderson J. W.* Oat bran increases serum acetate of hypercholesterolemic men // Am. J. Clin. Nutr. – 1992. – V. 56. – P. 455 – 459.

19. *Charles S., Lieber M.D.* Alcohol and the liver. Metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases // *The Mount Sinai Journals of Medicine.* – 2000. – 67, № 1. – P. 84-94.
20. *Crabendam P. M., Streckstra H., Teixeira de Matos M. J.* The effect of the degree of reduction of the carbon source on fermentation patterns // In proceedings of the 4th European congress on Biotechnology, Amsterdam: Elsevier Science Publishers. – 1987. – V. 1. – P. 546.
21. *Cummings J. H., Pomare E. W., Branch W. J. et al.* Short chain fatty acids in human large intestine portal, hepatic and venous blood // *Gut.* – 1987. – V. 28. – P. 1221 – 1227.
22. *Demeyer D. I., Graeve K. De.* Differences of stoichiometry between rumen and hindgut fermentation // *Advances in animal physiology and animal nutrition.* – 1991. – V. 22. – P. 50 – 61.
23. *Eftimiadi C., Buzzi E., Tonetti M.* Short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria alter the physiological responses of human neutrophils to chemotactic peptide // *J. Infect.* – 1987. – V. 14, N 1. – P. 43 – 53.
24. *Engelhardt W., Burmester M., Hansen K.* Effects of amiloride and ouabain on short-chain fatty acid transport in quinea pig large intestine // *J. Physiol.* – 1993. – V. 460. – P. 455 – 466.
25. *Engelhardt W., Rechkemmer G.* Segmental differences of short-chain fatty acid transport across quinea pig large intestine // *Experimental Physiology.* – 1992. – V. 77. – P. 491 – 499.
26. *Englyst H. N., Hay S., Macfarlane G. T.* Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria // *FEMS Microbiological Ecology.* – 1987. – V. 95. – P. 163 – 171.
27. *Eterlin C., McKeown A., Bingham S. A.* D-Lactate and acetate as markers of fermentation in man // *Gastroenterology.* – 1992. – V. 102. – P. 551.
28. *Floch M. H., Hong-Curtiss I.* Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2001. – V. 3, N 4. – P. 343 – 350.

29. *Fukumoto S., Tatewaki M., Yamada T.* Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2003. – V. 284, N 5. – P. R 1269 – R 1276.
30. *Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P.* Probiotics effects on immunity // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – V. 73, N 2. – P. 444 – 450.
31. *Levit D.* PKQuest: measurement of intestinal absorption and first pass metabolism – application to human ethanol pharmacokinetics // *BMC Clinical Pharmacology.* – 2002. – 2, № 4. – P. 40-62.
32. *Macfarlane G. T., Allison C.* Utilization of protein by human gut bacteria // *FEMS Microbiology Ecology.* – 1986. – V. 38. – P. 19 – 24.
33. *Macfarlane G. T., Gibson G. R.* Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements // *FEMS Microbiology Ecology.* – 1992. – V. 101. – P. 81 – 88.
34. *McNiel N. I.* The contribution of the large intestine to energy supplies in man // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1984. – V. 39. – P. 338 – 342.
35. *Peters S. G.* Portal and peripheral blood short chain fatty acid concentrations after caecal lactulose instillation at surgery // *Gut.* – 1992. – V. 33. – P. 1249 – 1252.
36. *Rothstein R. D., Rombeau J. L.* Nutrient pharmacotherapy for gut mucosal diseases // *Gastroenterol. North. Am.* – 1998. – V. 27, N 2. – P. 387 – 401.
37. *Scheppach W., Pomare E. W., Elia M.* The contribution of the large intestine to blood acetate in man // *Clin. Sci.* — 1991. — V. 80. — P. 177 – 182.
38. *Seitz H., Posche G.* The role of gastrointestinal factor in alcohol metabolism // *Alcohol. Alcoholism.* – 1997. – V. 32, N 5. – P. 543 – 549.
39. *Sellin J. H.* Short-chain fatty acids have polarized effects on sodium transport and intracellular pH in rabbit proximal colon // *Gastroenterology.* – 1998. – Vol. 114, N 4. – P. 737 – 747.
40. *Sheth P., Seth A., Trangavel M.* Epidermal growth factor prevents acetaldehyde-induced paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer // *Ibid.* – 2004. – V. 28, N 5. – P. 797 – 804.

41. *Umulis D., Giirmen N., Singh P.* A physiology based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings // *Alcohol.* – 2005. – 35. – P. 3-12.
42. *Weaver G. A., Krauser J. A., Miller T. L., Wolin M. J.* Short chain fatty acid distributions of enema samples from a sigmoidoscopy population: an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer // *Gut.* – 1988. – V. 29. – P. 1539 – 1543.
43. *Zhuk O., Zinkovsky V., Golovenko N.* The pharmacodynamics of anticonvulsant and subconvulsant effects of ethanol in CBA and C57BL/6 mice // *Alcohol.* – 2001. – 23. – P. 23-28.