

Н.А. Пальчикова, Н.П. Бгатова, А.И. Калмыкова, Е.Г. Скуридина,
Ю.Г. Дружинина, В.Г. Селятицкая

ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА ПРОБИОТИКА «БИОВЕСТИН-ЛАКТО» НА ТЕЧЕНИЕ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА И СТРУКТУРУ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск
ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск
ООО «Био-Веста», Новосибирск

У крыс с аллоксановым диабетом на фоне приема комплексного пробиотика «Биовестин-Лакто» ускоряются процессы нормализации углеводного обмена, усиливаются барьерные свойства эпителия, восстанавливается ультраструктура колоноцитов, активируются обменные процессы в интерстиции слизистой оболочки толстой кишки.

Ключевые слова: экспериментальные животные, аллоксановый диабет, гликемия, слизистая толстой кишки, пробиотик

Нарушение обмена веществ в организме при сахарном диабете приводит к развитию негативных изменений в структуре и функции разных органов, включая желудочно-кишечный тракт [2, 4, 8]. В клинических исследованиях показано, что выраженные нарушения кишечного микробиоценоза сопровождают тяжелое течение диабетического процесса; выявлена патогенетическая роль дисбактериоза в развитии осложнений сахарного диабета типа 1 у детей [5, 6]. В то же время имеются сообщения о положительном влиянии приема пробиотиков на течение сахарного диабета типа 1 [1]. Однако механизмы подобного рода эффектов пробиотиков практически не изучены.

Целью настоящего исследования было изучение состояния углеводного обмена и структуры слизистой оболочки толстой кишки у крыс с аллоксановым диабетом на фоне приема комплексного пробиотика «Биовестин-Лакто».

Методика

Эксперименты были проведены на половозрелых крысах-самцах Вистар, полученных из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Содержание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. №755).

Экспериментальных животных (n=69) делили на 4 группы: «К» — крысы, получавшие ежедневно в течение эксперимента per os по 0,5 мл молока (n=12); «БВ» — крысы, получавшие по той же

схеме по 0,5 мл пробиотика (n=15); «Ал» — крысы с аллоксановым диабетом, получавшие ежедневно в течение эксперимента per os по 0,5 мл молока (n=14); «Ал+БВ» — крысы с аллоксановым диабетом, получавшие по той же схеме по 0,5 мл пробиотика (n=28).

Экспериментальный сахарный диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением диабетогенной дозы аллоксана — 17 мг/100 г массы тела. Использовали жидкий комплексный пробиотик «Биовестин-Лакто» фирмы ООО «Биовеста», состоящий из 2 штаммов бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*), 1 штамма лактобактерий (*Lactobacterium plantarum*) и продуктов метаболизма представителей индигенной микрофлоры [3].

В динамике развития сахарного диабета измеряли массу тела, объем выпитой воды, диурез, глюкозурию и через 5 недель после введения аллоксана — уровень гликемии. Определение содержания глюкозы в моче и крови проводили с использованием наборов «FLUTEST®GLU» фирмы Bioscop.

Для морфологического исследования слизистой оболочки толстой кишки образцы органа фиксировали в 1% растворе OsO₄ на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толuidиновым голубым, изучали под световым микроскопом и выбирали участки тканей для исследования

в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35-45 нм на ультратоме LKB-8800, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010.

Определение процентного соотношения клеток в собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки проводили на полутонких срезах с помощью светооптического микроскопа при использовании квадратной тестовой системы (площадью 6400 мкм²). Долю межэпителиальных лимфоцитов и бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке определяли из расчета на 100 колоноцитов.

Морфометрию колоноцитов эпителиальной выстилки слизистой оболочки толстой кишки проводили при конечном увеличении в 42000 при помощи закрытой квадратной тестовой системы площадью 0,08 мкм² из 169 узловых точек с длиной тестовой линии 3,71 мкм.

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 5.5 («StatSoft», США). Достоверность различий между средними значениями после проведения дисперсионного анализа оценивали по критерию Стьюдента (с поправкой Бонферрони при множественных сравнениях). Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5% уровне значимости.

Данные в таблицах и тексте представлены в виде медианы (Me) или среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты

У животных из групп «К» и «БВ», т.е. без

диабета, значения таких прижизненных показателей, как прирост массы тела, объем потребляемой воды, диурез и экскреция глюкозы с мочой существенно не менялись на протяжении всего эксперимента. Так, недельная прибавка массы тела животных в обеих группах в среднем составила 10 г, суточный объем потребляемой воды — 10 мл/сут. Суточные диурез и глюкозурия в группе «К» составили 13 мл/сут и 0,007 г/сут, в группе «БВ» — 15 мл/сут и 0,004 г/сут соответственно. (Данные представлены в виде медианы по каждому изученному показателю.)

На 5-ой неделе эксперимента уровень глюкозы в крови у крыс из группы «К» составил $6,5 \pm 0,1$ ммоль/л, у крыс из группы «БВ» — $6,2 \pm 0,3$ ммоль/л.

В таблице 1 приведены результаты измерения прижизненных показателей у животных с аллоксановым диабетом. Через 1 неделю после введения аллоксана у крыс, не получавших пробиотик, снизилась масса тела, существенно увеличилась глюкозурия и, как следствие, выросли диурез и потребление воды по сравнению со здоровыми животными. Широкие интерквартильные размахи значений изученных показателей отражают высокую степень гетерогенности животных по их чувствительности к диабетогенному действию аллоксана.

На 3-5-ой неделях заболевания падение массы тела крыс замедлилось и прекратилось, однако глюкозурия и значения связанных с ней показателей — количество потребляемой воды и диурез, увеличились у большинства животных. Медиана значений содержания глюкозы в крови крыс из группы «Ал» на 5-ой неделе эксперимента была равна 40,3 ммоль/л.

Таблица 1

Результаты изучения прижизненных показателей у животных через 1, 3 и 5 недель после введения аллоксана

Показатель	Срок после введения аллоксана	Группа «Ал»			Группа «Ал+БВ»		
		Me	Процентили:		Me	Процентили:	
			25%	75%		25%	75%
Изменение массы тела за неделю (г)	1 неделя	-35	-60	-26	-25	-48	-4
	3 недели	-8	-15	4	0	-15	10
	5 недель	5	-5	10	10	-4	10
Объем потребленной воды (мл/сут)	1 неделя	83	54	98	73	28	109
	3 недели	95	23	115	43	15	111
	5 недель	100	15	110	75	13	100
Диурез (мл/сут)	1 неделя	77	54	85	69	28	102
	3 недели	97	26	111	49	13	107
	5 недель	115	20	119	76	18	114
Глюкозурия (г/сут)	1 неделя	6,1	2,6	7,3	1,2	0,04	6,8
	3 недели	4,8	2,2	7,9	5,0	0,01	9,3
	5 недель	9,9	0,02	11,3	7,2	0,12	11,5

При исследовании эпителиальной выстилки слизистой оболочки толстой кишки у крыс с аллоксановым диабетом, не получавших пробиотик (группа «Ал»), было отмечено возрастание количества бокаловидных клеток на 61% и межэпителиальных лимфоцитов на 85% по сравнению с контрольными животными (Таблица 2). Статистически значимых различий в клеточном составе собственной пластинки слизистой оболочки выявлено не было.

В слизистой оболочке толстой кишки крыс из группы «Ал» через 5 недель заболевания при электронно-микроскопическом исследовании отмечали структурные изменения, указывающие на снижение барьерных свойств эпителия, развитие дистрофических изменений колоноцитов, нару-

шение обменных процессов в интерстиции. Так о снижении барьерных свойств эпителия свидетельствовало уменьшение плотности клеточных контактов и возрастание размеров межэпителиальных пространств.

Дистрофические изменения колоноцитов проявлялись в снижении объемной, численной плотностей митохондрий и поверхностных плотностей их наружных и внутренних мембран; в уменьшении численной плотности секреторных вакуолей и расширении цистерн гранулярной эндоплазматической сети (Таблица 3). Следует отметить, что аналогичные изменения митохондрий — уменьшение количества крист, лизис наружных и внутренних мембран и др., были обнаружены при электронно-микроскопическом

Таблица 2

Результаты морфометрического анализа слизистой оболочки толстой кишки крыс через 5 недель эксперимента по данным светоптической микроскопии ($M \pm m$)

Показатель	Группа «К»	Группа «БВ»	Группа «Ал»	Группа «Ал+БВ»
Эпителиальная выстилка (N):				
— бокаловидные клетки	49,5±5,7	29,0±4,2 *	79,8±5,6 *	32,2±1,9 *#
— межэпителиальные лимфоциты	19,7±4,7	11,1±4,4	36,4±2,7 *	13,5±3,8 #
Собственная пластинка (NA):				
— макрофаги	12,5±1,1	18,6±1,2*	16,4±1,4	13,4±1,2
— плазматические клетки	15,0±1,2	25,0±1,2 *	20,3±1,8	20,5±1,6
— лимфоциты	22,4±1,5	12,2±1,6*	16,2±1,4	19,4±1,5
— тучные клетки	6,1±0,3	6,4±1,6	5,6±0,8	6,4±1,1
— фибробласты	15,3±1,6	11,2±1,6	16,4±1,4	13,2±1,2
— эозинофилы	9,8±1,2	24,1±1,8 *	16,4±1,8	25,8±1,3 *#

Примечание: N — количество бокаловидных клеток и межэпителиальных лимфоцитов, рассчитанное на 100 колоноцитов; NA — количество клеток в тестовой площади (%). * — статистически значимые различия с группой «К» — $p < 0,05$; # — статистически значимые различия с группой «Ал» — $p < 0,05$.

Таблица 3

Результаты морфометрического анализа цитоплазмы колоноцитов крыс через 5 недель эксперимента по данным электронной микроскопии ($M \pm m$)

Показатель	Группа «К»	Группа «БВ»	Группа «Ал»	Группа «Ал+БВ»
Митохондрии (Vv)	15,95±1,66	17,60±2,26	10,62±1,49*	13,17±1,96
Наружная мембрана митохондрий (Sv)	21,25±2,22	23,25±2,57	15,00±2,05*	18,60±2,42
Внутренняя мембрана митохондрий (Sv)	80,55±10,12	79,60±10,34	49,65±7,26*	62,30±8,20
Митохондрии (NA)	3,60±0,39	3,45±0,41	2,55±0,36	2,65±0,42
Комплекс Гольджи (Vv)	9,05±1,50	6,01±1,10	9,17±1,39	4,53±0,70* #
Комплекс Гольджи (Sv)	56,00±11,25	56,70±11,23	78,35±17,07	43,95±9,77
Секреторные вакуоли (Vv)	3,28±0,89	1,18±0,66	0,53±0,34*	1,54±0,87
Лизосомы первичные (Vv)	0,30±0,15	0,74±0,25	0,18±0,13	0,15±0,08
Лизосомы первичные (NA)	0,45±0,21	0,85±0,22	0,15±0,11	0,25±0,12
Гранулярная ЭПС (Vv)	2,69±0,44	2,57±0,42	3,73±0,40	3,67±0,43
Гранулярная ЭПС (Sv)	24,70±2,53	23,90±2,66	29,65±1,93	28,05±2,84
Рибосомы прикрепленные (NA)	19,05±2,76	15,00±2,97	26,00±2,66	17,70±3,66
Рибосомы свободные (NA)	14,45±1,27	10,15±1,47	12,85±1,10	8,60±0,98* #
Рибосомы свободные полисомальные (NA)	125,8±11,5	106,0±7,7	132,4±10,0	110,2±12,3

Примечания. Vv — объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы); NA — численная плотность структур (число в тестовой площади); Sv — поверхностная плотность структур (мкм² в 1 мкм³ объема цитоплазмы); ЭПС — эндоплазматическая сеть, * — статистически значимые различия с группой «К» — $p < 0,05$; # — статистически значимые различия с группой «Ал» — $p < 0,05$.

исследовании миокарда собак с аллоксановым диабетом [7]. Описанные изменения авторы расценивают как снижение функциональной активности митохондрий, считая это следствием дефицита инсулина в организме. Сопоставление собственных результатов и данных литературы позволяет предположить, что дистрофические изменения клеточных структур характерны для большинства тканей животных с аллоксановым диабетом и являются патогенетической основой общего снижения процессов жизнедеятельности при сахарном диабете.

Возрастание межклеточных пространств и снижение их электронной плотности вследствие набухания внеклеточного матрикса, а также накопление пучков коллагена вокруг нервных волокон и кровеносных капилляров являются структурными признаками нарушения обменных процессов в интерстиции.

У крыс с аллоксановым диабетом, получавших пробиотик (группа «Ал+БВ»), в начале эксперимента падала масса тела и увеличивалась экскреция глюкозы с мочой (Таблица 1). Между группами не было отмечено статистически значимых различий по каждому из приведенных в таблице показателей отдельно. Выше мы уже отмечали высокую гетерогенность животных по их чувствительности к диабетогенному действию аллоксана, поэтому был проведен анализ выраженности выявленных отклонений, оцененных по 10-балльной шкале. Полученная сумма баллов, характеризующих тяжесть течения диабета, была в 1,5 раза больше в группе «Ал», чем в группе «Ал+БВ» ($31 \pm 1,5$ и $20 \pm 2,3$ соответственно, $p < 0,05$).

Медиана значений содержания глюкозы в крови через 5 недель после введения аллоксана у крыс с диабетом на фоне приема пробиотика была равна 27,4 ммоль/л, при этом величина 25-го перцентиля уровня гликемии была ниже, чем в группе «Ал» в 2,8 раза, 75-го — в 1,2 раза.

Через 5 недель приема пробиотика у крыс из групп «БВ» и «Ал+БВ» уменьшилось количество бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке и увеличилось число эозинофилов в собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с животными из группы «К» (Таблица 2). Эти эффекты пробиотика проявились вне зависимости от развития аллоксанового диабета у экспериментальных животных. Количество межэпителиальных лимфоцитов в эпителиальной выстилке достоверно снизилось только у крыс из группы «Ал+БВ» по сравнению с животными из группы «Ал» (Таблица 2). Можно предположить, что в организме крыс с аллоксановым диабетом комплексный пробиотик «Биовестин-Лакто»

оказал дополнительное иммуномодулирующее действие.

У крыс с диабетом, получавших пробиотик в течение 5 недель, возросла плотность межклеточных контактов в эпителиальной выстилке слизистой оболочки толстой кишки. Произошло частичное восстановление ряда морфометрических показателей ультраструктурной организации колоноцитов до соответствующих значений у контрольных крыс (Таблица 3). При этом следует отметить, что значительных изменений в ультраструктурной организации колоноцитов у крыс из группы «БВ» по сравнению с контрольными животными обнаружено не было.

Признаки отека в интерстиции уменьшились. Структура эндотелиоцитов кровеносных капилляров свидетельствовала об усилении трансэндотелиального переноса: на люминальной поверхности отмечали большое количество микроворсинок, а в цитоплазме — многочисленные микропиноцитозные везикулы.

Заключение

У крыс с аллоксановым диабетом на фоне приема пробиотика выраженность нарушений углеводного обмена была меньше. В слизистой оболочке толстой кишки возрастали барьерные свойства эпителия, восстанавливалась ультраструктура колоноцитов, усиливались обменные процессы в интерстиции. Таким образом, корректирующее действие, которое оказал пробиотик «Биовестин-Лакто» на структурную организацию слизистой оболочки толстой кишки крыс с аллоксановым диабетом, может лежать в основе механизмов позитивного влияния восстановления кишечного микробиоценоза на течение сахарного диабета.

INFLUENCE OF PROBIOTIC «BIOVESTIN-LAKTO» ON ALLOXAN DIABETES COURSE AND LARGE INTESTINE'S MUCOUS MEMBRANE STRUCTURE IN EXPERIMENTAL ANIMALS

N.A. Palchikova, N.P. Bgatova, A.I. Kalmykova, E.G. Skuridina, Yu.G. Druzhinina, V.G. Selyatitskaya

In rats with alloxan diabetes, at intake of the combined probiotic «Biovestin-Lakto» normalization of carbohydrate metabolism processes are accelerated, epithelium barrier properties are increased, colonocyte's ultrastructure is recovered, metabolic processes in intersticium of large intestine's mucous membrane are activated.

Литература

1. Воронин А.А. Лечение дисбактериоза кишечника у детей, больных сахарным диабетом / А.А. Воронин, Л.А. Тараненко, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — № 3. — С. 22-24.

2. *Зенкина С.А.* Особенности состояния гастроэнтерологической системы у детей и подростков с инсулин-зависимым сахарным диабетом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / С.А. Зенкина. — Томск, 2000. — 20 с.

3. *Калмыкова А.И.* Пробиотики: Терапия и профилактика заболеваний. Укрепление здоровья / А.И. Калмыкова. — Новосибирск, 2001. — 208 с.

4. *Кравец Е.Б.* Диабетология: масштабы проблемы, достижения и перспективные направления / Е.Б. Кравец // Бюлл. сибирской медицины. — 2005. — № 1. — С. 9-17.

5. Патогенетическая роль дисбактериоза в развитии осложнений сахарного диабета 1-го типа у детей / Г.Н. Розанова, Д.А. Воеводин, М.А. Стенина, М.В. Кушнарева // Бюл. exper. биол. мед. — 2002. — Т. 133. — № 2. — С. 196-198.

6. Роль иммунологических реакций в адаптивном процессе у детей с сахарным диабетом типа I, филогенетическая концепция анτισрессорной адаптации / Д.А. Воеводин, Г.Н. Розанова, М.А. Стенина и др. // Клиническая иммунология. — 2003. — № 2. — С. 103-107.

7. Ультроструктурное проявление ранних метаболических нарушений в миокарде собак при аллоксановом диабете / Н.П. Лебкова, М.Ф. Бондаренко, О.Е. Колесова, Г.П. Азарян // Бюл. exper. биол. мед. — 1980. — Т. 89. — № 5. — С. 614-617.

8. *Цуканов В.В.* Клинико-биохимическая характеристика заболеваний желчевыводящих путей у больных сахарным диабетом / В.В. Цуканов, Е.В. Селиверстова, С.А. Догадин // Клиническая медицина. — 2005. — № 4. — С. 40-42.