

УДК 612.17:579.864.1/873.13:616.12-008.46-0.39

**СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕРДЦА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
В УСЛОВИЯХ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ****Е. В. Марцинкевич, Т. М. Студеникина, И. А. Мельников****Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск**

Цель: изучить влияние пробиотиков на структурно-функциональное состояние сердца в условиях моделирования хронической сердечной недостаточности у крыс.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на самцах белых крыс ($n = 38$). Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) моделировали путем двукратного подкожного введения изадрина (изопреналина гидрохлорид, Sigma) в дозе 80 мг/кг с интервалом 24 ч. Для гистологического исследования изымали участки левого желудочка, готовили криостатные срезы миокарда толщиной 10 мкм и окрашивали методом Маллори с последующей морфометрией при помощи светового микроскопа MPV-2 («Leitz», Германия) с цифровой фотокамерой «Leica». Концентрацию С-реактивного белка (С-РБ) в сыворотке определяли методом реакции агглютинации с латексом.

Результаты. Установлено, что прием препаратов «Диалакт» и «Бифидумбактерин» способствует сохранению диаметра КМЦ, приводит к уменьшению степени выраженности фиброза и очагов волнообразной деформации и вакуолизации сердечных миоцитов ($p < 0,05$). У всех животных с ХСН фиксировались определенные сывороточные уровни С-РБ (в среднем $156 \pm 15,2$ мг/л), тогда как ни у одного представителя контрольной группы он не был идентифицирован, так как находился за пределами чувствительности метода. У предварительно получавших препарат «Диалакт» число проб с определяемым количеством протеина сократилось до одной (48 мг/л) сравнительно с животными I группы, а у потреблявших «Бифидумбактерин» — до пяти ($86,4 \pm 28$ мг/л) в том же сопоставлении.

Заключение. Предварительное употребление пробиотических препаратов сопровождается сохранением структурной организации миокарда и понижением концентрации С-РБ в сыворотке крови, тем самым облегчая течение основного заболевания.

Ключевые слова: пробиотики, хроническая сердечная недостаточность (ХСН), миокард, С-реактивный белок (С-РБ).

**THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATUS OF HEART
IN CHRONIC HEART FAILURE IN THE PRELIMINARY USE OF PROBIOTICS****E. V. Martsynkevich, T. M. Studenikina, I. A. Melnikov****Institute for Physiology of NAS Belarus, Minsk
Belarusian State Medical University, Minsk**

Objective: to study the effect of probiotics on the structural and functional state of the heart in stimulated chronic heart failure in rats.

Materials and methods. The experiments were performed on male white rats ($n = 38$). CHF was simulated by double subcutaneous introduction of isoprenaline hydrochloride (Sigma) at a dose of 80 mg/kg at intervals of 24 hours. For histological examination we seized parts of the left ventricular myocardium, prepared cryostat sections of 10 micron thick and stained them by Mallory's method, followed by morphometry using a light microscope MPV-2 («Leitz», Germany) with the digital camera «Leica». The concentration of CRP in serum was measured by agglutination test with latex.

Results. It was ascertained that taking the drugs «Dialakt» and «Bifidumbacterin» contribute to preservation of the CMC diameter, which leads to a decrease in fibrosis evidence and areas of undulating deformation and vacuolization of cardiac myocytes ($p < 0.05$). All the animals with CHF detected certain serum CRP levels (average 172.8 ± 19.2 mg/l), whereas none of the control group revealed it, as it was beyond the sensitivity of the method. In the group of those who had taken «Dialakt», the number of samples with the amount of protein (48 mg/l) reduced to one compared to the animals of group I, while in the group taking «Bifidumbacterin» it reduced to five (86.4 ± 28 mg/l) in the same comparison.

Key words: probiotics, chronic heart failure, myocardium, CRP.

Введение

В последние десятилетия большой интерес уделяется вопросам функционального питания. Особое внимание в создании функциональных пищевых композиций уделяется нут-

риентам, играющим значительную роль в защите и адаптации организма, в частности, пробиотикам. Многочисленные исследования показали высокую эффективность пробиотиков в дерматологии, акушерстве, гинеколо-

гии, стоматологии, при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, ревматизме, туберкулезе, сахарном диабете и др. [1]. Однако показано, что при состояниях полиорганной недостаточности применение пробиотиков не рекомендуется из-за усугубления тяжести течения основного заболевания [2].

ХСН является наиболее частым и неблагоприятным в прогностическом отношении осложнением многих заболеваний сердечно-сосудистой системы. Это полифакторное, полиэтиологическое состояние, вовлекающее в патологический процесс многие органы и системы и в первую очередь миокард, кишечник, почки [3]. Одной из причин интоксикации при развитии ХСН является эндотоксин грамотрицательной флоры (липополисахарид клеточной стенки бактерий, ЛПС), приводящий к структурной перестройке стенки толстой кишки, в результате чего увеличивается ее проницаемость [4]. Ранее установлено, что внутрикишечное введение ЛПС в условиях нормы оказывает ингибирующее влияние на деятельность сердца [5], однако на фоне предварительной адреналовой нагрузки введение эндотоксина приводит к усилению эффекта катехоламина путем снижения парасимпатической активности и (или) увеличения симпатического тонуса эфферентных волокон, контролирующих работу сердца [6]. Проникновение эндотоксина в системный кровоток ведет к выработке провоспалительных цитокинов, оказывающих прямое действие на миокард путем локализованного синтеза кардиомиоцитами фактора некроза опухоли-альфа [3]. В исследованиях Н. А. Быловой показано, что сочетание пробиотических препаратов с селективной деконтаминацией у пациентов с ХСН I–IV функциональными классами (ФК) приводит к нормализации микрофлоры толстого кишечника и снижению эндотоксина в плазме крови, но поскольку уровень провоспалительных цитокинов достоверно не снижается, то использование пробиотиков пациентами с III–IV ФК ХСН может усилить проявление синдрома интоксикации [7]. Пробиотики, сами являясь микроорганизмами и источником эндотоксина, взаимодействуя с рецепторами кишечной стенки (CD-14, TLR, растворимыми рецепторами ФНО- α), снова запускают каскад реакций, приводящих к повышению уровня провоспалительных агентов, и оказывают прямое токсическое действие на органы и системы, тем самым поддерживая интоксикацию и воспаление на высоком уровне, что приводит к ухудшению течения ХСН и ее прогрессированию [7]. Доказано, что кишечные эндотоксины включены в процесс контроля функций организма и активируемые под их влиянием висцеральные афферентные волокна, а также продуцируемый в кишечник комплекс

гуморальных факторов опосредует диффузные неспецифические воздействия на нервные центры, органы и функциональные системы [8].

Цель работы

Изучить влияние пробиотиков на структурно-функциональное состояние сердца в условиях моделирования хронической сердечной недостаточности у крыс.

Материалы и методы

Исследования проведены на крысах-самцах 4-месячного возраста, начальной массой $230 \pm 2,0$ г в соответствии с принципами гуманного отношения к лабораторным животным. Все животные находились в стандартных условиях вивария. По условиям эксперимента I (контрольную) группу составили интактные животные ($n = 8$). Во II группу были включены особи, внутрижелудочно получавшие воду на протяжении 10 дней ($n = 10$). Крысам III группы ($n = 10$) проводилось внутрижелудочное введение препарата «Диалакт» в дозе 5×10^8 КОЕ лактобактерий. Животные IV группы ($n = 10$) интрагастрально получали пробиотик «Бифидумбактерин» в дозе 10^7 КОЕ бифидобактерий. Расчет доз проводился согласно инструкции к препаратам фирмы-производителя («Диалакт», Беларусь) и содержанию лакто- и бифидобактерий в кишечнике крысы [9]. По окончании кормления крысам II–IV групп моделировали ХСН путем инъекции изадрина (изопrenalина гидрохлорид, Sigma) в дозе 80 мг/кг дважды с интервалом 24 ч [10]. Через 14 суток животные выводились из опыта передозировкой наркоза (100 мг/кг тиопентала натрия, внутривенно). Для гистологического исследования изымали участки левого желудочка, готовили криостатные срезы миокарда толщиной 10 мкм, которые располагали на предметных стеклах в случайном порядке, и окрашивали методом Маллори (1900). Изучение микропрепаратов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа MPV-2 («Leitz», Германия) с цифровой фотокамерой «Leica» в увеличениях объектива: 6,3; 40. На малом увеличении оценивалась целостность микроскопической картины миокарда, на большом — соотношение компонентов сердечной ткани (КМЦ, соединительная ткань). Проведена калибровка системы анализа изображений, при которой найдено соответствие микрометров пикселям на экране монитора для определения размеров структурных элементов миокарда в абсолютных единицах — микрометрах без соответствующего пересчета по формулам. Выявление С-РБ сыворотки крови в образцах без признаков гемолиза проводили методом латексной агглютинации при помощи набора «Реагенты для определения С-РБ в реакции агглютинации

латекса» согласно инструкции фирмы-производителя (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Расчет количества белка выражали в мг/л согласно с последним титром сыворотки, разведение которой, дало положительный результат.

Статистическая обработка результатов осуществлялась при помощи программы «Statistica», 6.0. Показатели распределения данных проверялись тестом Шапиро-Уилка. Для установления статистической значимости результатов использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок или непараметрический тест Манна-Уитни. Данные представлены в виде средней величины и стандартного отклонения. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами установлено [11] снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС) у животных II группы с 373 ± 10 — в контроле до 341 ± 14 уд./мин при развитии ХСН. Однако предварительный прием пробиотиков не приводил к значимым изменениям ЧСС по отношению к особям с экспериментальной сердечной патологией, получавших воду. Также нами фиксировалось появление Q-зубца на ЭКГ, в норме не встречающегося у крыс [12], тогда как у крыс, получавших «Диалакт» и «Бифидумбактерин» частота проявления данного пика снижалась, $p < 0,05$ [11].

В связи с тем, что развитие ХСН у крыс сопровождалось более частым появлением Q-зубца на ЭКГ, чего не наблюдалось у животных с той же экспериментальной моделью сердечной патологии при предварительном применении пробиотиков, нами были проанализированы изменения миокарда в данных условиях.

На основании анализа морфологического состояния изучаемого участка сердца выявлено, что строение миокарда крыс в условиях нормы полностью соответствует классическим представлениям морфологии [13]. На микрофотографиях отсутствуют признаки нарушения сердечного ритма (рисунок 1, контроль, А). Диаметр кардиомиоцитов (КМЦ) составлял $9,7 \pm 2,3$ мкм, а соединительная ткань выявлялась только в интерстициальном пространстве между сердечными миоцитами и вокруг сосудов, площадь ее покрытия составляла $101,5 \pm 27,1$ мкм²/1 см² (рисунок 1, контроль, Б).

Развитие ХСН приводило к значительным структурным изменениям миокарда (рисунок 1, ХСН, А). Выявлялась гипертрофия КМЦ, диаметр которых увеличивался на 64,6 % (с $9,7 \pm 2,3$ мкм — в контроле до $16,1 \pm 1,9$ мкм — при развитии ХСН, $p < 0,05$). Локально отмечались очаги волнообразной деформации, вакуолизация и фрагментация

КМЦ (рисунок 1, ХСН, Б). Наблюдалось замещение сердечных миоцитов соединительной тканью, площадь которой составляла $6722,7 \pm 1113,0$ мкм²/1 см² (рисунок 1, ХСН, Б), что более чем в 60 раз превышает показатели контрольной группы ($p < 0,05$).

Предварительное применение пробиотиков «Диалакт» и «Бифидумбактерин» с последующим формированием ХСН сопровождалось сохранением диаметра КМЦ, который составлял $11,1 \pm 1,2$ мкм и $8,98 \pm 0,7$ мкм соответственно, что на 30,7 и 44,3 % меньше, чем у животных с экспериментальной патологией (рисунок 1, «Диалакт» + ХСН, «Бифидумбактерин» + ХСН, Б; $p < 0,05$). Степень повреждения миокарда (фиброз) был менее выражен и составлял $252,9 \pm 203,3$ мкм²/см² для «Диалакта» и $202,7 \pm 39,2$ мкм²/см² для «Бифидумбактерина», что на 96,2 и 97 % соответственно ниже, чем данная величина у животных с ХСН, получавших воду (рисунок 1, «Диалакт» + ХСН, «Бифидумбактерин» + ХСН, А; $p < 0,05$). Однако данные величины не достигали контрольных значений и оставались на повышенном уровне относительно интактных животных ($p < 0,05$). На микропрепаратах не наблюдались признаки нарушения ритма сердца, такие как волнообразная деформация и вакуолизация КМЦ (рисунок 1, «Диалакт» + ХСН, «Бифидумбактерин» + ХСН, Б).

Уменьшение повреждения миокарда мы связывали с влиянием пробиотических препаратов, что подтверждается нашими данными о качественном и количественном составе микробных популяций пристеночного и просветного биотопов [14, 15]. Так как изменения микрофлоры в условиях ХСН (увеличение популяций условно-патогенных представителей и снижение пула пробиотических микроорганизмов) может привести к транслокации ЛПС, вызывая хроническое воспаление и поддерживая интоксикацию на высоком уровне, мы исследовали уровень С-РБ в пробах сыворотки крови без гемолиза. В сыворотке крови животных с ХСН С-РБ выявлялся во всех анализируемых пробах ($n = 8$) и составлял $156 \pm 15,2$ мг/л, тогда как ни у одного представителя контрольной группы ($n = 8$) он не был идентифицирован, так как находился за пределами чувствительности теста. В крови крыс, предварительно получавших пробиотики, С-РБ качественно обнаруживался во всех тестируемых образцах. У особей, получавших «Диалакт» ($n = 7$), число проб с определяемым уровнем протеина сократилось до одной (48 мг/л) сравнительно с животными I группы, а у потреблявших «Бифидумбактерин» ($n = 8$) — до пяти ($86,4 \pm 28$ мг/л) в том же сопоставлении (таблица 1).

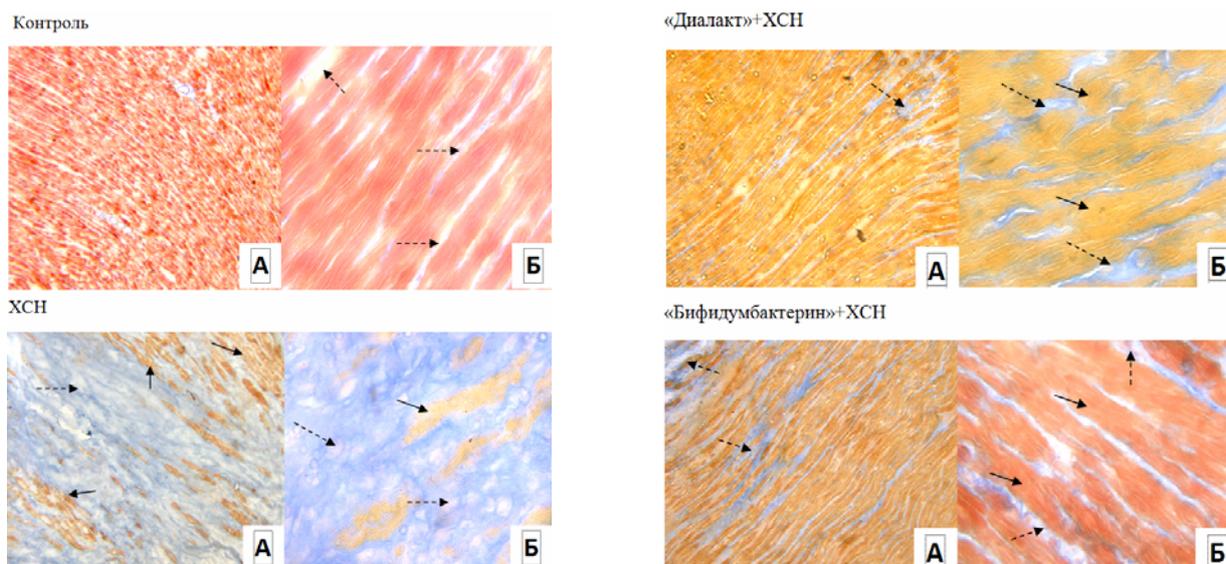


Рисунок 1 — Микроскопическая картина миокарда крыс разных экспериментальных групп: Окраска методом Маллори. Ув. об. 6,3 (А), 40 (Б). Стрелкой с пунктиром обозначена соединительная ткань, черной сплошной — фрагменты КМЦ

Таблица 1 — Изменение С-реактивного белка в сыворотке крови¹ экспериментальных животных

Показатель	I группа (контроль)	II группа (ХСН)	III группа («Диалакт» + ХСН)	IV группа (!Бифидумбактерин» + ХСН)
С-РБ, мг/л	Ниже 6,0	156 ± 15,2*	48,0	86±28,0*#

Примечание. * – значимые различия по отношению к контролю, # — значимые различия по отношению ко II экспериментальной группе. Уровень значимости при $p < 0,05$.

¹ – пробы сыворотки крови без гемолиза

Заключение

Проведенные исследования позволяют утверждать, что предварительное применение пробиотиков «Диалакт» и «Бифидумбактерин» оказывает положительный эффект на структурное состояние сердца в условиях развития хронической сердечной недостаточности. При изучении микропрепаратов миокарда отмечено уменьшение степени фиброза, сохранение объема кардиомиоцитов, отсутствие волнообразных деформаций и вакуолизации сердечных миоцитов, однако локально сохраняется их фрагментация. В крови наблюдается уменьшение концентрации С-РБ, что может указывать на снижение транслокации ЛПС в кровяное русло, оказывающего влияние на развитие патологического процесса в сердце, и уменьшение степени хронического воспаления.

Таким образом, нами установлено, что применение пробиотиков способствует восстановлению адаптационно-компенсаторных регуляторных механизмов и облегчает течение основного заболевания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Андреева, И. В. Потенциальные возможности применения пробиотиков в клинической практике / И. В. Андреева // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. — 2006. — Т. 8, № 2. — С. 151–172.

2. Sanders, M. E. Safety assessment of probiotic in human use / M. E. Sanders, L. M. Akkermans // Gut Microbes. — 2010. — Vol. 1, № 3. — P. 164–185.

3. Сорока, Н. Ф. Роль активации цитокинов в развитии и прогрессировании хронической сердечной недостаточности / Н. Ф. Сорока, Т. С. Зыбалова // Медицинские новости. — 2003. — № 1. — С. 12–15.

4. Хроническая сердечная недостаточность: структурные и микробиологические изменения в толстой кишке / Г. П. Арутюнов [и др.] // Терапевтический архив. — 2007. — № 2. — С. 31–37.

5. Солтанов, В. В. Роль эндотоксинов кишечника в модуляции деятельности сердца / В. В. Солтанов, Е. О. Полещук // Новости медико-биологических наук. — 2010. — Т. 1, № 2. — С. 144–148.

6. Полещук, Е. О. Усиление эффектов адреналина на деятельность сердца под влиянием эндотоксина кишечника / Е. О. Полещук // Новости медико-биологических наук. — 2010. — Т. 2, № 3. — С. 46–50.

7. Былова, Н. А. Особенности течения ХСН в зависимости от изменения микробиоценоза и структуры стенки толстой кишки: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.06 / Н. А. Былова; Рос. гос. мед. ун. — М., 2007. — 44 с.

8. Солтанов, В. В. Эндотоксины и нейрогуморальные механизмы регуляции вегетативных функций / В. В. Солтанов // Новости медико-биологических наук. — 2009. — № 4. — С. 109–119.

9. Интизаров, М. М. Микрофлора тела животных / М. М. Интизаров. — М., 1994. — 20 с.

10. Руководство по экспериментальным (доклиническим) исследованиям новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.

11. Марцинкевич, Е. В. Особенности деятельности сердца при хронической сердечной недостаточности в условиях предварительного применения пробиотиков // Сборник статей Международной научно-практической конференции молодых ученых «Научные стремления-2012», 6–9 ноября, 2012, Минск. — Минск: Беларуская навука, 2012. — С. 306–309.

12. Роцевская, И. М. Кардиоэлектрическое поле теплокровных животных и человека / И. М. Роцевская. — С-Пб.: Наука, 2008. — 250 с.

13. Кузнецов, С. Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии / С. Л. Кузнецов, В. Л. Мушкамбаров, В. Л. Горякина. — М.: Медицинское информационное агентство, 2007. — 600 с.

14. Марцинкевич, Е. В. Влияние пробиотиков на микробиоценоз пристеночного муцина толстого кишечника крыс при хронической сердечной недостаточности / Е. В. Марцинкевич, А. Э. Пыж // Теория и практика актуальных научных исследова-

ний. Часть 1. 29–31 июля, 2013, Люблин. — Люблин, 2013. — С. 90–96.

15. Марцинкевич, Е. В. Состояние просветной микрофлоры толстой кишки при хронической сердечной недостаточности на фоне длительного применения пробиотиков у крыс / Е. В. Марцинкевич, А. Д. Гавриленя // Проблемы здоровья и экологии. — 2013. — № 3. — С. 114–119.

Поступила 07.07.2014

УДК 616.34 – 007.272:616.15:577.127.4] - 092.9

ДИНАМИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ И КИШЕЧНОГО СОДЕРЖИМОГО У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

Д. В. Угольник, Т. В. Козловская

Гомельский государственный медицинский университет

Изучены изменения антиоксидантной активности сыворотки крови и кишечного содержимого у экспериментальных животных через 12, 24, 36 часов от начала моделирования острой кишечной непроходимости (ОКН). В эксперимент включены 77 половозрелых самцов беспородных белых крыс, которые составили опытную ($n = 27$) и контрольную ($n = 50$) группы. ОКН у крыс сопровождается угнетением антиоксидантных свойств сыворотки крови и кишечного содержимого, развитием эндотоксикоза уже в первые сутки ОКН. У животных с ОКН в сыворотке крови и кишечном содержимом происходят однонаправленные изменения антиоксидантного статуса, но в последнем протекающие с большей интенсивностью. Полученные данные показывают необходимость применения препаратов с антигипоксической направленностью в программе комплексной терапии при лечении ОКН.

Ключевые слова: антиоксидантная активность сыворотки крови, антиоксидантная активность кишечного содержимого, окислительный стресс, острая кишечная непроходимость, беспородные белые крысы.

THE DYNAMICS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BLOOD SERUM AND INTESTINAL CONTENT IN EXPERIMENTAL ANIMALS IN SIMULATED ACUTE INTESTINAL OBSTRUCTION

D. V. Ugolnik, T. V. Kozlovskaya

Gomel State Medical University

The article studies the changes of antioxidant activity of blood serum and intestinal content in experimental animals 12, 24, 36 hours after simulated acute intestinal obstruction (AIO). The experiment included 77 adult male inbred albino rats, which were included into trial ($n = 27$) and control ($n = 50$) groups. AIO in the rats is accompanied by inhibition of antioxidant properties of the serum and intestinal content, the development of endotoxemia already within the first day of AIO. The animals with AIO have unidirectional changes of the antioxidant status in the serum and intestinal content, but later occurring with greater intensity. These data show the need for application of antihypoxic oriented drugs in the comprehensive therapy program of AIO treatment.

Key words: antioxidant activity of serum, antioxidant activity of intestinal content, oxidative stress, acute intestinal obstruction, white rats.

Введение

Острая кишечная непроходимость (ОКН) остается одной из наиболее сложных нозологий в экстренной хирургии [1–5]. Энтеральная недостаточность является основной составляющей кишечной непроходимости и эндотоксикоза, приводящего к полиорганной недостаточности. Одним из ведущих звеньев патогенеза порочного круга в развитии энтеральной недостаточности при ОКН является гипоксия, развивающаяся вследствие нарушения кровоснабжения кишечника [6, 7, 8]. Гипоксия в кишечной стенке приводит к деструктивным процессам в слизистой оболочке

кишечного эпителия [2]. При этом сначала появляются сосудистые расстройства: отек и полнокровие слизистой оболочки, резкое расширение в ней капилляров и венул, агрегация форменных элементов крови, кровоизлияния и отек стромы. В дальнейшем возникает деструкция слизистой оболочки, а затем и других слоев кишечной стенки [9].

Одной из основных причин неблагоприятного исхода при ОКН является перитонит, развивающийся вследствие прогрессирования патологического процесса, при отсутствии адекватного оперативного пособия и интенсивного консервативного лечения [3, 4].