

ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

Марцинкевич Е.В., Солтанов В.В.
Институт физиологии НАН Беларуси
Минск, 220072, ул. Академическая, 28
lmartinkevich@mail.ru

Введение. В связи с широкой распространенностью разнообразной молочнокислой продукции, содержащей различные штаммы микроорганизмов, возникает вопрос о целесообразности включения их в рацион пациентов с системными заболеваниями, в частности с патологией сердечно-сосудистой системы. В настоящее время вопрос о механизмах системного влияния пробиотиков с рецепторов желудочно-кишечного тракта на другие органы, в частности на сердце, изучен недостаточно. Кроме того остается малоизученным вопрос о влиянии на организм отечественных препаратов.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на крысах самцах (n=100) с соблюдением правил гуманного отношения к лабораторным животным. Животные были разделены на 4 группы: I – интактный контроль (стандартный рацион питания, n=16); II – особи на протяжении 10 дней получавшие воду (n=28); III и IV – крысы в течение 10 дней получавшие пробиотики «Диалакт», n=28, «Диалек», Беларусь) и «Бифидумбактерин», n=28, («Диалек», Беларусь) соответственно. По окончании сроков кормления животным II-IV групп моделировали хроническую сердечную недостаточность путем двукратного введения изопреналина гидрохлорида (изадрин, Sigma) в дозе 80 мг/кг подкожно [1], которая согласуется с развитием хронической сердечной недостаточности (ХСН) I-II функциональных классов у человека [2]. Дозу рассчитывали согласно инструкции к препаратам и содержанию популяций лакто- и бифидобактерий в кишечнике животных, она составляла 5×10^8 КОЕ лакто- и 10^7 КОЕ бифидобактерий. Через 14 суток после последней инъекции животных выводили из эксперимента путем введения тиопентала натрия в дозе 100 мг/кг. Методика проведения электрофизиологического исследования деятельности сердца подробно описана в [3]. Для гистологического исследования изымали участки левого желудочка и нисходящей ободочной кишки, готовили криостатные срезы толщиной 10 мкм и окрашивали методом Маллори (миокард) и гематоксилин-эозином (стенка кишки) с последующей морфометрией при помощи светового микроскопа MPV-2 («Leitz», Германия) с цифровой фотокамерой «Leica». Микробиологический анализ проводили в соответствии с общепринятыми методиками [4].

Данные обработаны при помощи программы Статистика 6.0. Нормальность распределения данных проверялась тестом Шапиро-Уилка. При межгрупповом сравнении средних использовали t-критерий Стьюдента или непараметрический тест Манна-Уитни. Данные представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней и считались достоверными при уровне значимости менее 0,05.

Результаты и их обсуждение. Моделирование ХСН у крыс сопровождалось достоверным снижением частоты сердечных сокращений (ЧСС) на 8,5 % ($P < 0,05$). Предварительное применение пробиотиков «Диалакт» и «Бифидумбактерин» не вызывало статистически значимых изменений ритма сердца по отношению к животным с ХСН, получавших воду и не достигало показателей интактной группы, различия оставались достоверными. Измерение кардиоинтервалов электрокардиограммы (ЭКГ) выявило достоверное увеличение длительности интервала TP на 36,9 % у животных II группы по сравнению с контролем ($P < 0,05$), что коррелирует с удлинением интервала RR и падением частоты сердечных сокращений. Предварительное введение «Диалакта» не влияло на индуцируемые изадрином изменения указанных параметров. Применение «Бифидумбактерина» предотвращало вызванное изопреналином удлинение интервала TP на

34 % ($P < 0,05$), который утрачивал достоверность в сравнении с контролем. При анализе амплитуды зубцов ЭКГ показано, что ХСН вызывала достоверный рост амплитуды зубца Р на 34,4 % ($P < 0,05$), что может указывать на усиление сократимости миокарда предсердий. У животных, предварительно потреблявших «Диалакт», отмечалось снижение Р-пика относительно животных II группы и приближение его амплитуды к значениям контроля. У крыс, предварительно получавших «Бифидумбактерин», высота зубца Р достоверно превышала контрольные значения, оставаясь на повышенном уровне. На записи ЭКГ отмечалось появление Q-зубца, который в норме не встречается у крыс. У животных с экспериментальной ХСН данный зубец наблюдается в 75,5 % случаев, у подопытных группы диалакт – в 40 %, у особей группы бифидумбактерин – в 50%.

Анализ показателей variability сердечного ритма выявил нарастание как симпато- так и парасимпатических влияний, с преобладанием преимущественно последних при моделировании ХСН у крыс. Об этом свидетельствует повышение RMSSD на 28 %, MxDMn на 23 % ($P < 0,05$), что подтверждается увеличением суммарной мощности вегетативной регуляции сердечного ритма на 10 % ($P < 0,05$). Предварительный прием «Диалакта» снижал степень сдвигов изучаемых показателей: CV на 16,3 %, RMSSD на 23,8 %, MxDMn на 23,6 % соответственно ($P < 0,05$), и приближал их значение к цифровым выражениям контрольных особей. Это свидетельствует об ослаблении как холин-, так и адренергических влияний на регуляцию сердечного ритма. Применение же «Бифидумбактерина» приводило к достоверному снижению только RMSSD на 23,8 % ($P < 0,05$), что указывает на ослабление активности парасимпатической составляющей ВСР.

На следующем этапе изучали структурные изменения миокарда в данных условиях. Структура сердечной мышцы интактных крыс полностью соответствовала классическим морфологическим критериям: отсутствовали волнообразные деформации, вакуолизация кардиомиоцитов (КМЦ) и другие признаки нарушения сердечного ритма. Диаметр КМЦ находился в пределах $9,79 \pm 0,73$ мкм, а соединительная ткань присутствовала только в интерстициальном пространстве между ними и вокруг сосудов. Площадь покрытия составляла $101,54 \pm 8,56$ мкм / 1 см^2 . На фоне ХСН происходила структурная реорганизация миокарда. Она сводилась к гипертрофии КМЦ, диаметр которых увеличивался на 64,6 % ($P < 0,05$), появлению локальных очагов волнообразной деформации, вакуолизации и фрагментации КМЦ; замещению сердечных миоцитов соединительной тканью, площадь которой составила $6722,7 \pm 352$ мкм / 1 см^2 , более чем в 60 раз превышая таковую в контрольной группе ($P < 0,05$). Предварительное использование «Диалакта» и «Бифидумбактерина» сдерживало развитие вызываемой ХСН гипертрофии КМЦ, диаметр которых составлял $11,17 \pm 0,37$ мкм и $8,98 \pm 0,23$ мкм. Снижалась степень фиброзного поражения миокарда, сокращающегося до $252,9 \pm 64,3$ мкм/ см^2 для «Диалакта» и $202,74 \pm 12,39$ мкм/ см^2 для «Бифидумбактерина». Однако эти величины не достигали контрольных значений. На микропрепаратах не наблюдалось волнообразной деформации и вакуолизации КМЦ.

Для выявления механизмов протекторного действия тестируемых пробиотиков мы исследовали микробный пейзаж толстого кишечника. Особенности изменений микробных ассоциаций полостного содержимого толстого кишечника была описана нами ранее [5].

Анализ биотопа пристеночного муцина показал, что у с ХСН содержание лактобацилл оказалось ниже на 53,3%, а бифидобактерий лишь на 9,6% относительно интактных животных ($P < 0,05$). В биоптатах толстого кишечника этих особей присутствовали условно-патогенные микроорганизмы: не ферментирующие лактозу *E. coli*, золотистый стафилококк, дрожжеподобные грибы и плесени, которые в контроле не выявлялись. Предварительное применение «Диалакта» увеличивало пул лактобактерий на 48,7 %, а бифидобактерий на 8,2% относительно животных II группы ($P < 0,05$). Бактерии группы кишечной палочки были представлены лактозоположительными *E.coli* и эшерихиями со сниженной ферментативной активностью. Грамположительные кокки *Staphylococcus spp.* – эпидермальным стафилококком, который отсутствовал в контрольной и II экспериментальной группах, а

также золотистым стафилококком, титр которого уменьшался на 32,2% по сравнению с II группой ($P < 0,05$). Дрожжеподобных грибов и плесеней в биоптатах кишечника крыс, получавших «Диалакт», не обнаружено. При введении в рацион «Бифидумбактерина» численность лактобацилл возрастала на 25,5%, а бифидобактерий на 4% по сравнению с животными II группы ($P < 0,05$). Пул *E.coli* с нормальной ферментацией соответствовал таковому в контроле. Однако в муцине обнаруживались и лактозоотрицательные эшерихии, чье содержание было на 9,1 % ниже ($P < 0,05$), чем у животных, потреблявших воду. Введение крысам «Бифидумбактерина» также сдерживало накопление золотистого стафилококка, о чем свидетельствовало снижение его микробного титра на 22,9 % по сравнению с животными II группы ($P < 0,05$). Препарат также способствовал элиминации дрожжеподобных грибов и плесеней, количество которых достоверно редуцировалось на 48% ($P < 0,05$) по отношению к животным, получавшим воду.

Так как изменения микрофлоры, особенно в условиях сердечной патологии могут приводить к транслокации бактериальных токсинов, которая в свою очередь зависит от состояния кишечного барьера, мы провели гистологическое исследование стенки толстой кишки. Микроскопическая картина, визуализированная у интактных крыс, полностью соответствовала классическим представлениям морфологии. Особи с ХСН, продемонстрировали признаки наличия умеренного кишечного воспаления. Они сводились к увеличению подслизистой основы на 84,86% ($P < 0,05$) и инфильтрации ее клетками макрофагальной системы. Численность и объем бокаловидных клеток не подвергались модификациям, как и остальные слои (слизистый, мышечный, серозный) кишечной стенки. Заблаговременное внесение в питьевой рацион пробиотиков «Диалакт» и «Бифидумбактерин» с последующим формированием ХСН сопровождалось восстановлением подслизистого слоя. Его толщина уменьшилась на 53,18 и 30,5 % соответственно ($P < 0,05$). При этом «Диалакт» приближал данный показатель к величине, фиксированной в контрольной группе. На микропрепаратах также отсутствовали признаки инфильтрации подслизистого слоя, количество и объем бокаловидных экзокриноцитов не изменялся.

Заключение. Предварительный прием «Диалакта» и «Бифидумбактерина» при моделировании ХСН предотвращает нарушение микробного баланса и ингибирует воспалительный процесс в кишечнике крыс. Таким образом, предварительное применение пробиотиков обладает протекторным действием на слизистый барьер кишки, препятствуя проникновению микробных метаболитов во внутреннюю среду организма, тем самым способствуя сохранению структуры миокарда.

Литература

1. Руководство по экспериментальным (доклиническим) исследованиям новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. И доп. – М.: Медицина. – 2005. – 832 с.
2. Terrlink J.R., Pfeffer J.M., Pfeffer M.A. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats // *Circulation Research*. – 1994. – Vol. 75, No 1. – P. 105–113.
3. Марцинкевич Е.В. Висцерокардиальные эффекты, инициируемые глюкозой, вводимой в двенадцатиперстную кишку // *Новости мед.-биол. наук*. – 2012. – Т. 6, № 3. – С. 27–31.
4. Корнеев М.Л., Воробьев А.А., Миронов А.Ю., Лыкина Е.В. Штаммовая общность пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта на биологической модели // *Человек и его здоровье*. – 2006. - № 2. – С. 18–24.
5. Марцинкевич Е.В., Гавриленя А.Д. Состояние просветной микрофлоры толстой кишки при хронической сердечной недостаточности на фоне длительного применения пробиотиков у крыс // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2013. – № 3. – С. 114–119.

PREVENTIVE EFFECT PROBIOTICS UNDER THE SIMULATION OF CHRONIC HEART FAILURE IN RATS

E. V. MARTSYNKEVICH, V.V. SOLTANOV
Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

Summary

Prevention reception «Dialakt» and «Bifidumbacterin" in modeling chronic heart failure prevents violation of the microbial balance and inhibit inflammation in the intestine of rats. Thus, the provisional application of probiotics has a protective effect on the gut mucosal barrier, preventing the penetration of microbial metabolites into the internal environment, thus contributing to the preservation of myocardial structure.

Key words: probiotics, chronic heart failure, microflora, miocardium, intestine.