

МЕДИЦИНА

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

Е. В. МАРЦИНКЕВИЧ¹, член-корреспондент В. В. СОЛТАНОВ¹,
Т. М. СТУДЕНИКИНА², И. А. МЕЛЬНИКОВ²

**ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ПРИЕМА ПРОБИОТИКОВ
НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС СЕРДЦА
В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск²Белорусский государственный медицинский университет, Минск

Поступило 05.01.2014

Введение. В последние десятилетия возрос интерес к вопросам функционального питания. Особое внимание в создании функциональных пищевых композиций уделяется пробиотикам, играющим значительную роль в защите и адаптации организма. Многочисленные исследования показали их высокую эффективность в дерматологии, акушерстве, гинекологии, стоматологии, при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, ревматизме, туберкулезе, сахарном диабете и др. [1].

Хроническая сердечная недостаточность (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 (липолисахарид 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, по показателям ВСП, к усилению эффекта катехоламинов путем снижения парасимпатических влияний 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 [3]. Пробиотики, сами являясь микроорганизмами и источником эндотоксина, взаимодействуя с рецепторами кишечной стенки (CD-14, TLR), снова запускают каскад реакций, приводящих к повышению уровня провоспалительных агентов, и оказывают свое 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].

В связи с изложенным выше цель настоящей работы – изучить влияние пробиотиков на морфо-функциональное состояние миокарда в условиях моделирования хронической сердечной недостаточности у крыс.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на крысах самцах 4-месячного возраста начальной массой $230,0 \pm 2,0$ 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 группе были включены животные, внутрижелудочно получавшие воду на протяжении 10 дней ($n = 11$). Испытуемым III группы ($n = 10$) осуществлялось внутрижелудочное введение препарата «Диалакт» в дозе $5 \cdot 10^8$ 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 (Диалек, Беларусь) и содержанию лакто- и бифидобактерий в кишечнике крысы [9]. По окончании кормления у крыс II–IV групп моделировали ХСН путем инъекции изадрина (изопrenalина гидрохлорид, Sigma) в дозе 80 мг/кг дважды с интервалом 24 ч [10]. Животные подвергались исследованию на 14-е сутки после последней инъекции изадрина. Регистрацию и анализ электрокардиограммы (ЭКГ) проводили в остром опыте согласно методике, описанной в [11]. Для гистологического исследования изымали участки левого желудочка, готовили криостатные срезы миокарда на криостате Micron HM 525 (Япония) толщиной 10 мкм и окрашивали методом Маллори (1900). Изучение микропрепаратов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа MPV-2 (Leitz, Германия) с цифровой фотокамерой Leica. 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-реактивного белка (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 (ЭКОлаб, Россия). Расчет количества белка выражали в мг/л согласно последним титрам 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 стандартной ошибки средней. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что изадриновая модель ХСН (введение изопrenalина гидрохлорида) у крыс ($n = 11$) приводила к достоверному снижению ЧСС с $373,00 \pm 10,28$ до $341,30 \pm 14,35$ уд/мин по отношению к показателям интактной группы ($p < 0,05$; таблица, группы I и II). Предварительное применение пробиотиков не вызывало статистически значимых изменений ритма сердца: $341,30 \pm 14,35$ уд/мин – у особей только с изадриновой моделью и $337,9 \pm 11,7$ и $356,6 \pm 9,5$ уд/мин после приема соответственно «Диалакта» и «Бифидумбактерина» (таблица, группы III и IV).

Измерение интервалов и сегментов ЭКГ выявило достоверное ($p < 0,05$) увеличение длительности TP с $39,6 \pm 4,6$ мс в контроле до $54,2 \pm 5,8$ мс при формировании экспериментальной ХСН, что коррелирует с удлинением RR с $161,7 \pm 4,4$ до $178,1 \pm 6,5$ мс и падением ЧСС (таблица, группы I и II). Действие до изадрина введенного «Бифидумбактерина» сопровождалось сокращением выше указанного интервала с $54,2 \pm 5,8$ мс при формировании ХСН (без применения пробиотика) до $35,7 \pm 4,5$ мс ($p < 0,05$, таблица, группы II и IV). Применение «Диалакта» не приводило к статистически значимым изменениям длительностей интервалов ЭКГ по отношению к животным с моделью ХСН (таблица, группы II и III).

При анализе амплитуды зубцов ЭКГ выявлено, что изадриновая модель ХСН вызывает достоверное увеличение амплитуды зубца P с $82,8 \pm 12,6$ в контроле до $111,3 \pm 9,0$ мкВ ($p < 0,05$), что может указывать на усиление сократимости миокарда предсердий (таблица, группа I и II). У животных с экспериментальной ХСН, предварительно потреблявших «Диалакт», отмечалось снижение P-пика с $111,3 \pm 9,0$ у особей только с ХСН до $94,8 \pm 9,4$ мкВ после приема пробиотика (таблица, группы II и III). Хотя данное изменение не носило достоверного характера, однако наблюдалось у всех исследуемых данной группы. У крыс, предварительно получавших «Бифидумбактерин», высота зубца P не менялась и оставалась на таком же уровне (110 ± 8 мкВ) относи-

Параметры ЭКГ при предварительном введении пробиотиков с последующим формированием ХСН

Показатель	Группа I (интактные животные), $n = 8$	Животные с экспериментальной ХСН		
		Группа II (введение воды), $n = 11$	Группа III (введение «Диалакта»), $n = 10$	Группа IV (введение «Бифидумбактерина»), $n = 10$
ЧСС, уд/мин	$373,0 \pm 10,28$	$341,30 \pm 14,35^*$	$337,9 \pm 11,7$	$356,6 \pm 9,5$
P-R, мс	$48,70 \pm 1,16$	$49,5 \pm 1,5$	$53,4 \pm 2,3$	$54,5 \pm 2,5$
R-S, мс	$11,20 \pm 0,33$	$10,8 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,6$	$9,90 \pm 0,15$
S-T, мс	$62,2 \pm 4,3$	$62,9 \pm 1,6$	$65,2 \pm 2,9$	$68,9 \pm 1,8$
T-P, мс	$39,6 \pm 4,6$	$54,2 \pm 5,8^*$	$49,4 \pm 5,9$	$35,7 \pm 4,5^{**}$
R, мкВ	$492,7 \pm 97,5$	$585,9 \pm 53,9$	$531,8 \pm 60,7$	$557,2 \pm 90,5$
P, мкВ	$82,8 \pm 12,6$	$111,3 \pm 9,0^*$	$94,8 \pm 9,4$	$110,0 \pm 8,0$
S, мкВ	$178,3 \pm 32,4$	$185,7 \pm 36,0$	$341,2 \pm 10,3$	$191,6 \pm 43,6$
T, мкВ	$76,2 \pm 19,8$	$79,0 \pm 8,1$	$80,6 \pm 10,6$	$85,3 \pm 8,6$
Q, мкВ	0	$65,51 \pm 7,75$	$67,8 \pm 24,1$	$102,5 \pm 41,5$
SDNN, мс	$1,30 \pm 0,05$	$1,56 \pm 0,12$	$1,27 \pm 0,07$	$1,50 \pm 0,09$
RMSSD, мс	$1,64 \pm 0,04$	$2,10 \pm 0,16^*$	$1,60 \pm 0,07^{**}$	$1,76 \pm 0,08^{**}$
CV, %	$0,78 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,05^*$	$0,72 \pm 0,02^{**}$	$0,83 \pm 0,06$
MxDMn, мс	$8,02 \pm 0,42$	$9,90 \pm 1,28^*$	$7,56 \pm 0,28^{**}$	$9,61 \pm 1,15$
Mo, мс	$160,4 \pm 4,6$	$174,3 \pm 6,9^*$	$174,70 \pm 5,68$	$1,66 \pm 4,90$
AMo, %	$28,81 \pm 0,88$	$27,7 \pm 1,9$	$31,10 \pm 1,47$	$26,60 \pm 1,74$

Примечания: * – различия достоверны относительно показателей контрольной группы ($p < 0,05$); ** – различия достоверны относительно значений животных II группы ($p < 0,05$).

тельно группы животных с ХСН (таблица, группы II и IV). Остальные интервалы и зубцы ЭКГ значимых альтераций не претерпевали. Сводные данные представлены в таблице.

Помимо этого используемая модель ХСН достоверно ($p < 0,05$) повышала такие параметры ВСР, как RMSSD, MxDMn, Mo на 28,0, 23,0 и 8,7 % соответственно, что подтверждается увеличением показателя суммарной мощности вегетативной регуляции сердечного ритма (CV) на 10 % (таблица, группы I и II). Полученные данные свидетельствуют о нарастании как симпатических, так и парасимпатических нервных влияний, вносящих вклад в регуляцию сердечной деятельности [11].

Предварительный прием «Диалакта» снижал степень сдвигов изучаемых показателей CV, RMSSD, MxDMn на 16,3; 23,8 и 23,6% соответственно ($p < 0,05$) (таблица, группы II и III). Это

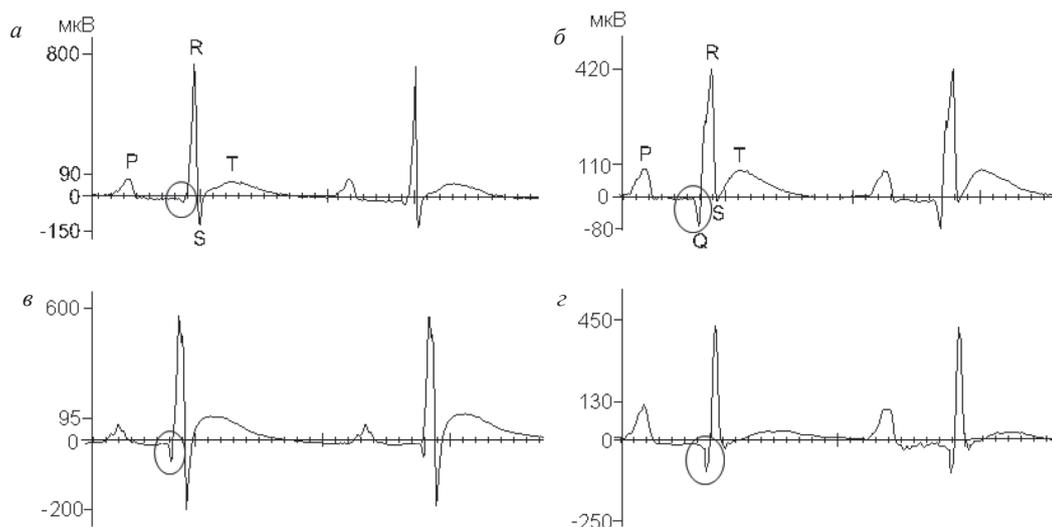


Рис. 1. Фрагменты записи ЭКГ различных экспериментальных групп: а – интактные животные; б – особи с экспериментальной ХСН, на протяжении 10 суток предварительно получавшие воду; в и z – особи, предварительно получавшие «Диалакт» и «Бифидумбактерин» в дозах $5 \cdot 10^8$ КОЕ лактобактерий и 10^7 КОЕ бифидобактерий соответственно в течение 10 дней с последующим формированием ХСН путем введения изопреналина гидрохлорида

свидетельствует об ослаблении как холин-, так и адренергических влияний на регуляцию сердечного ритма, что коррелирует с падением показателя суммарной мощности вегетативной регуляции 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 (таблица, группы II и IV).

Согласно источникам литературы [12], зубец Q ЭКГ обычно не регистрируется у крыс. В наших опытах данный потенциал также не выявлялся, но только у интактных животных (рис. 1, а). У особей с экспериментальной ХСН зубец Q наблюдался во всех опытах и составлял по высоте $65,5 \pm 7,8$ мкВ (рис. 1, б). У подопытных животных, предварительно употреблявших «Диалакт», появление Q-пика отмечалось в 4 экспериментах из 10, амплитуда которого была равна $67,8 \pm 24,1$ мкВ (рис. 1, в). Потребление «Бифидумбактерина» с последующим формированием ХСН сопровождалось появлением данного зубца в 7 опытах из 10, при этом высота его увеличивалась до $102,5 \pm 41,5$ мкВ (рис. 1, г). Однако не наблюдалось достоверных альтераций амплитудных характеристик данного пика ($p > 0,05$).

Таким образом, результаты данных серий экспериментов свидетельствуют, что при использовании изадриновой модели ХСН не все показатели ЭКГ претерпевают достоверные изменения (таблица). Соответственно этому протекторные эффекты испытываемых препаратов также выражены незначительно.

Последующие опыты предприняты с целью изучения в тех же методических условиях изменения структуры сердечной мышцы и содержания С-реактивного белка в сыворотке крови.

Изучение морфологического состояния изучаемого участка сердца показало, что строение миокарда левого желудочка крыс в условиях нормы полностью соответствовало классическим морфологическим канонам (рис. 2, контроль) [13]. Диаметр кардиомиоцитов (КМЦ) составлял $9,7 \pm 0,7$ мкм, а соединительная ткань выявлялась только в интерстициальном пространстве между сердечными миоцитами и вокруг сосудов, площадь ее покрытия составляла $101,0 \pm 8,0$ мкм/см² (рис. 2, контроль).

Развитие ХСН приводило к значительным структурным изменениям миокарда (рис. 2, ХСН). Выявлялась гипертрофия КМЦ, диаметр которых увеличивался на 64,6 % (до $16,1 \pm 0,6$ мкм; $p < 0,05$). Локально отмечались очаги волнообразной деформации, вакуолизация и фрагментация КМЦ. Наблюдалось замещение сердечных миоцитов соединительной тканью, площадь которой составляла 6700 ± 350 мкм/см², что более чем в 60 раз превышала показатели контрольной группы ($p < 0,05$).

Предварительное применение пробиотиков «Диалакт» и «Бифидумбактерин» с последующим формированием ХСН сопровождалось уменьшением диаметра КМЦ, который составлял

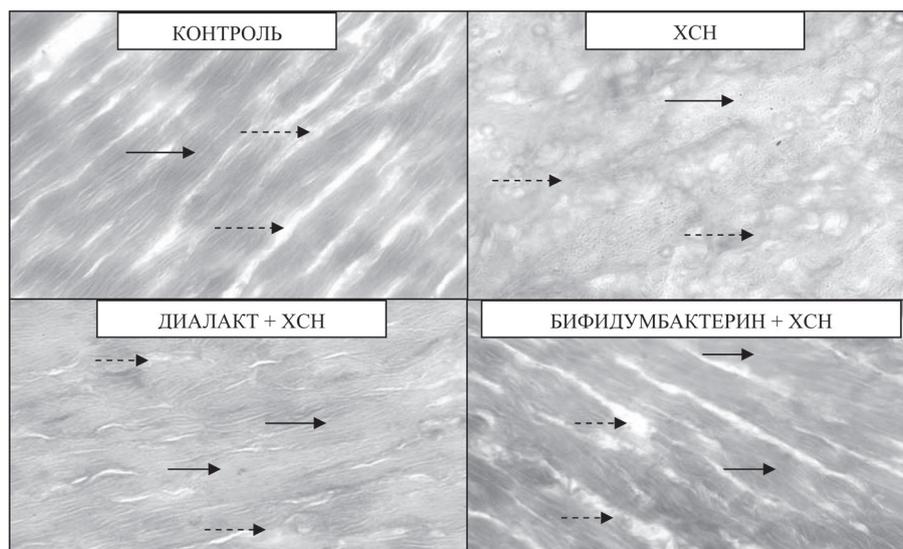


Рис. 2. Микроскопическая картина миокарда крыс разных экспериментальных групп. Окраска методом Маллори. Ув. об. 40. Черной стрелкой с пунктиром обозначена соединительная ткань, сплошной – КМЦ

11,1 ± 0,3 и 9,0 ± 0,2 мкм соответственно, что на 30,7 и 44,3 % меньше, чем у животных с экспериментальной патологией (рис. 2, Диалакт + ХСН, Бифидумбактерин + ХСН; $p < 0,05$). Степень повреждения миокарда (фиброз) была менее выражена и составляла 252,9 ± 203,3 мкм/см² для «Диалакта» и 202,7 ± 39,2 мкм/см² для «Бифидумбактерина», что на 96,2 и 97,0 % соответственно ниже, чем данная величина у животных с ХСН, получавших воду (рис. 2, Диалакт + ХСН, Бифидумбактерин + ХСН; $p < 0,05$). На микропрепаратах отсутствовали характерные для функциональных расстройств сердца такие признаки, как волнообразная деформация и вакуолизация КМЦ (рис. 2, Диалакт + ХСН, Бифидумбактерин + ХСН).

Так как изменение микробных ассоциаций толстого кишечника в условиях моделирования ХСН (увеличение популяций условно-патогенных представителей и снижение пула пробиотических микроорганизмов), установленное нами [14; 15] и другими авторами [3], может привести к транслокации ЛПС, вызывая хроническое воспаление и поддерживая интоксикацию на высоком уровне, мы исследовали уровень С-РБ в пробах сыворотки крови. В сыворотке крови животных с ХСН С-РБ выявлялся во всех анализируемых пробах ($n = 8$) и составлял 156,0 ± 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 II группы, а у потреблявших «Бифидумбактерин» ($n = 8$) до пяти (86,4 ± 28,0 мг/л) в том же сопоставлении. Изменения во всех случаях носили достоверный характер ($p < 0,05$).

Вывод. На основании результатов проведенных исследований можно заключить, что предварительное применение пробиотиков «Диалакт» и «Бифидумбактерин» оказывает положительный эффект на функциональное состояние сердца. Так, отмечено снижение частоты проявления нетипичного для крыс Q-зубца на ЭКГ. Применение препаратов «Диалакт» и «Бифидумбактерин» не отменяло вызванных изадрином эффектов, касающихся ЧСС. Введение в рацион «Бифидумбактерина» связано с сокращением интервала ТР по отношению к группе особей с ХСН. Следствием применения «Диалакта» явилось снижение амплитуды зубца Р, повышаемой у особей с сердечной патологией. Анализ ВСР выявил уменьшение параметров ВСР по отношению к группе особей с ХСН, что указывает на ослабление парасимпатических влияний, вызванных инъекцией изадрина у животных, получавших «Диалакт». Добавление в рацион «Бифидумбактерина» сопровождалось только падением значения RMSSD без изменения суммарной мощности вегетативной регуляции, что отражает снижение активности блуждающего нерва.

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 свидетельствует о снижении транслокации ЛПС в кровяное русло, оказывающем влияние на развитие патологического процесса в сердце, и уменьшении степени хронического воспаления.

Таким образом, нами установлено, что пробиотики «Диалакт» и «Бифидумбактерин» способствуют восстановлению адаптационно-компенсаторных регуляторных механизмов и облегчают течение нарушений в деятельности сердца.

Авторы выражают благодарность сотруднику кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии БГМУ канд. биол. наук О. Е. Осипук за методическую помощь в осуществлении экспериментов.

Работа выполнена при поддержке гранта Национальной академии наук Беларуси № 4 от 02.08.2013.

Литература

1. Андреева И. В. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2006. Т. 8, № 2. С. 151–172.
2. Сорока Н. Ф., Зыбалова Т. С. // Медицинские новости. 2003. № 1. С. 12–15.
3. Арутюнов Г. П., Кафарская Л. И., Савелов Н. А. и др. // Терапевт. архив. 2007. № 2. С. 31–37.

4. Солтанов В. В., Полецук Е. О. // Новости медико-биологических наук. 2010. Т. 1, № 2. С. 144–148.
5. Полецук Е. О. // Новости медико-биологических наук. 2010. Т. 2, № 3. С. 46–50.
6. Былова Н. А. Особенности течения ХСН в зависимости от изменения микробиоценоза и структуры стенки толстой кишки: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.06 / Рос. гос. мед. ун-т. М., 2007. – 44 с.
7. Солтанов В. В. // Новости медико-биологических наук. 2009. № 4. С. 109–119.
8. Интизаров М. М. Микрофлора тела животных. М., 1994. – 20 с.
9. Руководство по экспериментальным (доклиническим) исследованиям новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. М., 2005. – 832 с.
10. Марцинкевич Е. В. // Новости медико-биологических наук. 2012. Т. 6, № 3. С. 27–31.
11. Баевский Р. М. // Вестн. аритмологии. 2001. № 24. С. 65–86.
12. Роцевская И. М. Кардиоэлектрическое поле теплокровных животных и человека. СПб., 2008. – 250 с.
13. Кузнецов С. Л., Мушкамбаров В. Л., Горячкина В. Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. М., 2007. – 600 с.
14. Марцинкевич Е. В., Пыж А. Э. // Теория и практика актуальных научных исследований. Ч. 1: 29–31 июля, 2013. Люблин, 2013. С. 90–96.
15. Марцинкевич Е. В., Гавриленя А. Д. // Проблемы здоровья и экологии. 2013. № 3. С. 114–119.

E. V. MARTSYNKEVICH, V. V. SOLTANOV, T. M. STUDENIKINA, I. A. MELNIKOV

lmartinkevich@mail.ru

EFFECT OF THE PRELIMINARY INTAKE OF PROBIOTICS ON THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATUS OF THE HEART WITH ITS CHRONIC FAILURE

Summary

A preliminary intake of probiotics has a positive effect on the structural and functional status of the heart with its chronic failure. There was a decrease in the frequency of a pathological Q-wave on ECG, reducing the fibrosis degree and the conservation of the volume of cardiomyocytes; wavy deformations and cardiac myocyte vacuolization were not seen. There was a decrease in blood concentrations of CRP.