

О. М. Радчук, О. І. Цирюк, Т. О. Лісяна, І. Г. Пономарьова,  
Т. В. Берегова, В. К. Рибальченко

## Морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки щурів за умов тривалої гіпергастринемії та при введенні мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний”

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

*Досліджено вплив тривалої гіпергастринемії (28 днів) на морфометричні показники слизової оболонки товстої кишки (висота слизової оболонки, поперечний переріз епітеліоцитів та їх ядер, ядерно-цитоплазматичне співвідношення) і кількісний та видовий склад мікробіоценозу товстої кишки щурів, а також вплив на них мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний”. Показано, що тривала гіпергастринемія викликає гіперпластичні зміни зі збільшенням висоти слизової оболонки, збільшенням площі поперечного перерізу епітеліоцитів і зменшенням площі поперечного перерізу їх ядер та зниженням ядерно-цитоплазматичного індексу. Разом з тим підвищується рівень умовно-патогенної флори в товстій кишці. Введення щурам мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” відновлювало мікрофлору товстої кишки і сприяло нормалізації висоти слизової оболонки та ядерно-цитоплазматичного індексу, зменшенню площі поперечного перерізу епітеліоцитів та збільшенню площі поперечного перерізу їх ядер.*

Значна кількість захворювань шлунково-кишкового тракту (синдром Золлінгера — Еллісона, атрофічний гастрит) супроводжується підвищенням рівня гастрину в крові, який через свою проліферативну дію може спричиняти порушення проліферації та диференціації клітин. Це призводить до розвитку диспластичних процесів та новоутворень, у зв'язку з чим увагу дослідників привертає трофічний вплив гастрину на слизову оболонку шлунка і товстої кишки [1–3]. При таких захворюваннях часто застосовуються препарати типу “Омез<sup>®</sup>”, діючою речовиною якого є омепразол. Нез'ясованою залишається роль гіпергастринемії у виникненні дисбактеріозів товстої кишки, оскільки розбалансованість процесів оновлення слизової оболонки змінює кількісний та якісний склад мікрофлори. Лакто- та біфідобактерії, забезпечуючи ферментацію харчових волокон і полісахаридів з утворенням коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК), серед яких найбільшу активність має масляна кислота як індуктор апоптозу, регулюють процеси оновлення слизової оболонки [4]. У зв'язку з цим доцільним є вивчення морфологічних змін слизової оболонки товстої кишки при введенні мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” за умов тривалої гіпергастринемії.

Дослідження проводились на 30 самцях білих щурів лінії Wistar масою 160–200 г. Першу (контрольну) групу склали щури, які протягом 28 днів отримували 0,2 мл води для ін'єкцій. Щурам другої групи вводили внутрішньоочеревинно “Омез<sup>®</sup>” виробництва Dr. Reddy's Laboratories (Індія), діюча речовина якого — омепразол — є інгібітором  $H^+$ - $K^+$ -АТФази, що бере участь у секреції соляної кислоти парієтальними клітинами. Показано, що при введенні омепразолу в дозі 14 мг/кг протягом 28 днів зростання рівня гастрину в крові досягає 368% [5]. Омепразол вводили протягом 28 днів у дозі 14 мг/кг один раз на добу,

розчиняючи в 0,2 мл води для ін'єкцій. Щури третьої групи протягом 28 днів одночасно з введенням омепразолу отримували мультипробіотик “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” концентрований рідкий виробництва ТОВ “О. Д. Пролісок” протягом двох тижнів у дозі 0,3 мл/кг (еквівалент дитячої дози) і в дозі 0,03 мл/кг (еквівалент дози для дорослих) перорально. Мультипробіотик “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” є живою біомасою симбіозу 14 штамів біфідобактерій, лактобацил, лактококів та пропіоновокислих бактерій; у 10 мл препарату міститься не менше  $10^9$  живих клітин.

Через добу після закінчення введення води, омепразолу та омепразолу з симбітером проводили аналіз видового та кількісного (у колонієутворюючих одиницях — КУО) складу мікрофлори кишки шляхом висіву 1 мл з кожного десятикратного розведення фекальних мас на діагностичні середовища.

Після бактеріологічного дослідження щурів піддавали декапітації та видаляли товсту кишку, яку фіксували у 10% нейтральному формаліні і заливали в парафін. Парафінові зрізи завтовшки 5–7 мкм виготовляли на роторному мікротомі, забарвлювали гематоксиліном та еозином за Б'ємером [6]. Гістологічні препарати аналізували при збільшенні мікроскопа  $\times 100$  та  $\times 400$ . Обчислення проводили на мікрофотографіях за допомогою програмного забезпечення UTHSCSA ImageTool. Кольорові мікрофотографії отримували за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX-41 (Olympus Europe GmbH, Японія). Статистичну обробку даних здійснювали з використанням програми Statistica 6.0. Рівень значення приймався  $p < 0,05$ .

Початкові зміни слизової оболонки, що є характерними для розвитку гіперпластичного процесу, виявляються у збільшенні рядності епітеліального шару, зміні розмірів клітин та ядер, появі декількох ядерців і зміні ядерно-цитоплазматичного співвідношення [7].

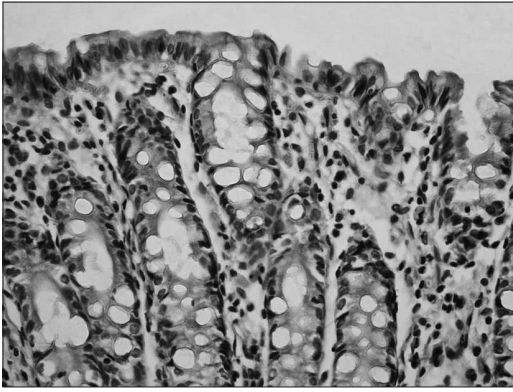
Результати досліджень показали, що висота слизової оболонки товстої кишки щурів контрольної групи (рис. 1, а) становила  $(451,21 \pm 14,57)$  мкм, площа поперечного перерізу епітеліоцитів —  $(10,01 \pm 0,172)$  мкм<sup>2</sup>, площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів —  $(1,9 \pm 0,127)$  мкм<sup>2</sup>. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення дорівнювало  $0,189 \pm 0,014$  (табл. 1). Мікрофлора кишки у контрольних щурів характеризувалася широким спектром транзитної мікрофлори. У 90% інтактних тварин патогенна мікрофлора з кишечника не висівалась (табл. 2).

У щурів, яким протягом 28 днів вводили омепразол (див. рис. 1, б), висота слизової оболонки товстої кишки у порівнянні з контролем збільшилась на 33,57% ( $p < 0,001$ ), площа поперечного перерізу епітеліоцитів — на 24,75% ( $p < 0,001$ ), площа поперечного перерізу

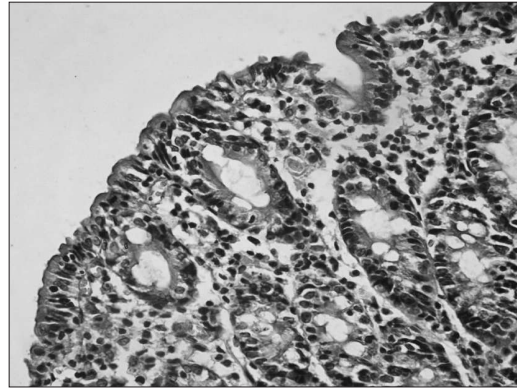
Таблиця 1. Вплив мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” на морфологічні показники слизової оболонки щурів,  $n = 10$  ( $M \pm SD$ )

| Показник  | Контроль           | Омес                     | Симбітер + омес             |
|---|--------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Висота епітеліального шару, мкм                                 | $451,21 \pm 14,57$ | $602,66 \pm 9,4^{***I}$  | $479,83 \pm 14,51$          |
| Площа поперечного перерізу епітеліоцитів, мкм <sup>2</sup>      | $97,32 \pm 5,31$   | $121,41 \pm 4,45^{***I}$ | $110,83 \pm 4,02^{***I,II}$ |
| Площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів, мкм <sup>2</sup> | $42,69 \pm 2,31$   | $36,76 \pm 2,63^{***I}$  | $47,35 \pm 2,04^{***I,II}$  |
| Ядерно-цитоплазматичне співвідношення                           | $0,44 \pm 0,014$   | $0,31 \pm 0,035^{***I}$  | $0,43 \pm 0,027$            |

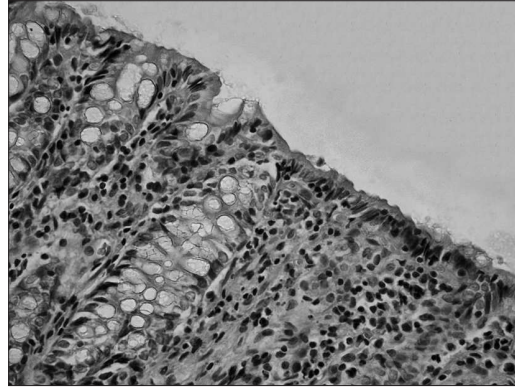
\*\*\*Різниця статистично вірогідна в порівнянні з контролем (I) та в порівнянні з групою, яка отримувала лише омепразол (II) ( $p < 0,001$ ).



а



б



в

Рис. 1. Мікрофотографії слизової оболонки товстої кишки щурів контрольної групи (а), після хронічного введення омепразолу протягом 28 діб (б) і після введення омепразолу та “Симбітеру<sup>®</sup> ацидофільного” протягом 28 діб (в). Забарвлення гематоксилином та еозином.  $\times 400$

ядер епітеліоцитів зменшилась на 13,89% ( $p < 0,001$ ), ядерно-цитоплазматичне співвідношення також зменшилось на 29,55% ( $p < 0,001$ ) (див. табл. 1).

Отримані результати свідчать про розвиток гіперплазії слизової оболонки товстої кишки, яка, за даними [1, 2], є наслідком гіпергастринемії, викликаній омепразолом — ефективним блокатором виділення соляної кислоти [3, 5]. Таким чином, гіпергастринемія, викликана омепразолом, спричиняє порушення скоординованості процесів проліферації та диференціації клітин.

Бактеріологічні дослідження вмісту кишечника у щурів з гіпергастринемією дозволили виявити негативні зміни мікробіоценозу, які полягають у дисбалансі між показниками умовно-патогенної та нормальної мікрофлори (див. табл. 2). У 70% щурів зареєстровано дефіцит індигенної мікрофлори.

Виходячи з наведених даних, доцільним було вивчити вплив пробіотиків на морфологічний стан слизової оболонки за умов тривалої гіпергастринемії, оскільки, як було показано, на її тлі відбувається розвиток дисбіотичних процесів. Встановлено, що тривале (протягом 28 діб) одночасне введення омепразолу та “Симбітеру<sup>®</sup> ацидофільного” (див. рис. 1, в) сприяє нормалізації досліджених показників (див. табл. 1). Висота епітеліального шару знижувалася на 25,6% у порівнянні з такою у щурів, що отримували лише омепразол, та статис-

тично достовірно не відрізнялась від контролю. Площа поперечного перерізу епітеліоцитів знижувалася на 9,55% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з показником щурів з гіпергастринемією, однак порівняно з контрольною групою залишалася збільшеною на 13,88% ( $p < 0,001$ ). Площа поперечного перерізу ядер епітеліоцитів збільшувалася на 22,37% ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з такою при введенні “Омезу<sup>®</sup>”, а у порівнянні з контрольною групою — на 10,92% ( $p < 0,001$ ). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення зростало на 27,9% ( $p < 0,001$ ) і досягало значення контрольної групи (див. рис. 1, в, табл. 1).

Результати мікробіологічного дослідження свідчать про те, що введення тваринам “Симбітеру<sup>®</sup> ацидофільного” супроводжується нормалізацією показників контамінації кишечника представниками умовно-патогенної та нормальної мікрофлори (див. табл. 2). Відновлення висоти слизової оболонки товстої кишки та ядерно-цитоплазматичного індексу у щурів, які одержували разом з омепразолом “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний”, можна пояснити дією КЛЖК, у першу чергу масляної, пропіонової та оцтової кислот. КЛЖК є головними кінцевими продуктами ферментації лактобактеріями та біфідумбактеріями нерозщеплюваних полісахаридів та харчових волокон у товстій кишці [8–10]. Масляна кислота є не лише одним з головних джерел енергії колоноцитів, частка якого в їх енергозабезпеченні становить до 70%, а й сильним диференціовальним і антипроліферативним агентом. На даний час велика увага приділяється масляній кислоті як важливному активатору апоптозу за рахунок інгібування гістонової деацетилази, активації гена *Cdx2*, який кодує кишковий транскрипційний фактор-регулятор розвитку епітелію, або зменшення експресії та активності інтегринів, які забезпечують сполучення між цитоскелетом та позаклітинним матриксом, а також за рахунок аутофагії [11–13]. Крім того, КЛЖК притаманна пряма антибактеріальна дія за рахунок зниження рН вмісту товстої кишки [4, 8].

Таблиця 2. Вплив мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” на показники мікрофлори товстої кишки щурів, КУО/см<sup>2</sup>

| Мікроорганізм  | Контроль   | Омез        | Симбітер + омез |
|--|------------|-------------|-----------------|
| Кишкова паличка  | 7,3 ± 0,03 | 3,6 ± 0,04* | 7,8 ± 0,03*     |
| Кишкова паличка зі зміненими ферментативними властивостями | 3,0 ± 0,02 | 6,8 ± 0,05* | 2,1 ± 0,03*     |
| Кишкова паличка лактозонегативна                           | 2,0 ± 0,01 | 8,1 ± 0,02* | 1,9 ± 0,02*     |
| Кишкова паличка гемолітична                                | —          | 6,0 ± 0,03  | —               |
| Клебсієла  | 4,8 ± 0,03 | 7,3 ± 0,04* | 4,8 ± 0,04*     |
| Цитробактер  | 3,5 ± 0,05 | 7,1 ± 0,05* | 2,9 ± 0,05*     |
| Протей   | 4,3 ± 0,03 | 6,3 ± 0,02* | 3,8 ± 0,02*     |
| Ентеробактер   | 4,1 ± 0,04 | 6,5 ± 0,03* | 3,9 ± 0,03*     |
| Гафнія   | 3,4 ± 0,03 | 7,0 ± 0,04* | 4,2 ± 0,02*     |
| Едвардсієла  | 3,0 ± 0,02 | 7,1 ± 0,01* | 2,9 ± 0,03*     |
| Морганела  | 3,7 ± 0,02 | 7,1 ± 0,02* | 3,8 ± 0,02*     |
| Стафілокок золотистий                                      | 2,3 ± 0,04 | 5,3 ± 0,03* | 2,2 ± 0,04*     |
| Стафілокок епідермальний з гемолізом                       | —          | 5,2 ± 0,04  | —               |
| Стафілокок епідермальний                                   | 4,9 ± 0,01 | 5,1 ± 0,05  | 4,1 ± 0,05      |
| Стафілокок сапрофітний                                     | 4,4 ± 0,02 | 4,0 ± 0,02  | 4,2 ± 0,01      |
| Ентерокок  | 6,3 ± 0,04 | 3,4 ± 0,03* | 6,1 ± 0,02*     |
| Гриби роду <i>Candida</i>                                  | 3,8 ± 0,05 | 5,2 ± 0,02* | 3,4 ± 0,03*     |
| Біфідобактерії   | 9,0 ± 0,02 | 4,6 ± 0,03* | 9,6 ± 0,04*     |
| Лактобацили  | 7,5 ± 0,03 | 5,1 ± 0,04* | 8,0 ± 0,02*     |

\*Різниця статистично вірогідна в порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ).

Отже, на підставі результатів дослідження, відновлення слизової оболонки товстої кишки у щурів, які одержували разом з омепразолом “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний”, можна пояснити проліферативним та трофічним впливом КЛЖК, насамперед масляної кислоти, що утворюється з харчових волокон, що містять целюлозу, пектини, геміцелюлозу та крохмаль, за допомогою мікроорганізмів, які входять до складу мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” [9, 13].

Встановлено, що на фоні гіперплазії слизової оболонки товстої кишки, викликаній тривалою гіпергастринемією, відбувається зростання рівня умовно-патогенної мікрофлори зі зміненими біологічними властивостями. Результатом подальшого розвитку цих процесів можуть бути прогресування запальних процесів та формування на їх тлі злоякісних новоутворень товстої кишки. Введення щурам мультипробіотика “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” одночасно з введенням “Омезу<sup>®</sup>” запобігає формуванню дисбіотичних змін у кишечнику на тлі гіпергастринемії та сприяє стабілізації високого вмісту лактобактерій і біфідумбактерій. Таким чином, “Симбітер<sup>®</sup> ацидофільний” можна рекомендувати з профілактичною метою в комплексному лікуванні хвороб шлунково-кишкового тракту, які супроводжуються гіперацидністю (хвороба Золлінгера — Еллісона, виразкова хвороба, атрофічний гастрит), панкреатитів, хвороби Баррета, гастроєзофагального рефлюксу та ін. Перспективним напрямком досліджень є і вивчення терапевтичного впливу пробіотиків на морфологічні показники слизової оболонки товстої кишки щурів при наявності гіпергастринемії.

1. *McGregor D. B., Jones R. D., Karlin D. A., Romsdahl M. M.* Trophic effects of gastrin on colorectal neoplasms in the rat // *Ann. Surg.* – 1982. – **195**, No 2. – P. 219–223.
2. *Renga M., Brandi G., Paganelli G. M. et al.* Rectal cell proliferation and colon cancer risk in patients with hypergastrinemia // *Gut.* – 1997. – **41**. – P. 330–332.
3. *Waldum H. L., Gustafsson B., Fossmark R., Qvigstad G.* Antiulcer drugs and gastric cancer // *Digestive Diseases and Sciences.* – 2005. – **50**, Suppl. 1. – P. S39–S44.
4. *Leach J. D.* Evolutionary perspective on dietary intake of fibre and colorectal cancer // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2007. – **61**. – P. 140–142.
5. *Цирюк О. І., Берегова Т. В.* Вплив омепразол-викликаній гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // *Вісн. пробл. біології і медицини.* – 2001. – Вип. 3. – С. 38–41.
6. *Белоус Т. А.* Патоморфология предраковых состояний толстой кишки // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2002. – **12**, № 4. – С. 50–55.
7. *Льилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – Москва: Мир, 1969. – 648 с.
8. *Bouhnik Y., Raskine L., Simoneau G. et al.* The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans // *Nutrit. J.* – 2006. – **5**, No 8. – P. 15–21.
9. *Licht T. R., Hansen M., Poulsen M., Dragsted L. O.* Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota // *Microbiology.* – 2006. – **6**, No 98. – P. 38–48.
10. *Topping D. L., Clifton P. M.* Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides // *Physiol. Rev.* – 2001. – **81**, No 3. – P. 1031–1064.
11. *Chen J., Ghazawi F. M., Bakkar W., Li Q.* Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B // *Mol. Cancer.* – 2006. – **5**, No 71. – P. 20–31.
12. *Domon-Dell C., Wang Q., Kim S. et al.* Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells // *Gut.* – 2002. – **50**. – P. 525–529.
13. *Янковский Д. С., Бережной В. В., Шутько Е. Е. и др.* Настоящее и будущее пробиотиков как биокорректоров микрoэкологических нарушений // *Соврем. педиатрия.* – 2004. – **1**, № 2. – С. 111–118.

O. M. Radchuk, O. I. Tsiruk, T. O. Lisjana, I. G. Ponomareva, T. V. Beregova,  
V. K. Rybalchenko

**Morphometric characteristics of rat's colonic mucous coat in the presence of long-lasting hypergastrinemia and during the administration of multiprobiotic "Symbiter<sup>®</sup> acidophilic"**

*The influence of long-lasting hypergastrinemia (28 days) on the morphometric characteristics of colonic mucous coat (mucous coat height, cross-sectional area of epithelial cells and their nuclei, nucleocytoplasmic correlation) and the quantitative and species compositions of rat's colon microbiocenosis, as well as the influence of multiprobiotic "Symbiter<sup>®</sup> acidophilic" on the studied characteristics, are investigated. It is shown that long-lasting hypergastrinemia causes hyperplastic alterations accompanied with an increase in the mucous coat height and the cross-sectional area of epithelial cells and with a decrease in the cross-sectional area of nuclei, as well as a decrease of the nucleocytoplasmic correlation. At the same time, an increase of opportunistic colon microflora is observed. The multiprobiotic "Symbiter<sup>®</sup> acidophilic" administration to rats recovers colonic microflora and promotes the restitution of the mucous coat height and the nucleocytoplasmic correlation, a decrease of the cross-sectional area of epithelial cells and an increase of the cross-sectional area of their nuclei as well.*