СТАТЬЯ

УДК 616.379-008.64:612.332.2

КИШЕЧНОЕ ПИЩЕВАРЕНИЕ УГЛЕВОДОВ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ КРЫС

[1]Кучкарова Л.С., [2]Рохимова Ш.О.

[1]Национальный университет Узбекистана, Ташкент, e-mail: Lyuba.kuchkarova@mail.ru;
[2]Ургенчский филиал Ташкентской медицинской академии, Ургенч, e-mail: Shirin2111@mail.ru

В опытах на беспородных белых крысах было выявлено влияние аллоксан-индуцированного диабета на массу тела, тонкой кишки, гистоструктуру кишечника, а также на заключительную стадию гидролиза углеводов в тонкой кишке. Диабет был вызван однократной внутрибрюшинной инъекцией аллоксана моногидрата (170 мг/кг). Исследовали только тех аллоксанобработанных крыс, у которых уровень глюкозы в крови был в 3 раза больше, чем в контроле. Оказалось, что у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом имело место уменьшение массы тела (на 23,1 %) и массы тонкой кишки (на 23,6 %). При этом нарушение гистологической структуры проявлялось как в мукозе, так и в серозе тонкой кишки. Это выражалось в уменьшении плотности миоцитов и эпителиоцитов стенки тонкой кишки, наличии эдемы слизистой, кровенаполнении капилляров, десквамации эпителиоциотов. Кроме того, у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом на 10-й день после введения аллоксана моногидрата имело место увеличение активности кишечных мембраносвязанных дисахаридаз. Активность мальтазы, сахаразы и лактазы у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом была соответственно на 25,6; 47,2 и 84,6 % больше по сравнению с крысами контрольной группы. Следовательно, аллоксан-индуцированный диабет приводит к уменьшению массы тела и тонкого кишечника крыс, нарушению гистоструктуры стенки тонкой кишки, а также увеличению специфической активности кишечных мальтазы, сахаразы и лактазы.

Ключевые слова: аллоксан-индуцированный диабет, глюкоза, инсулин, С-пептид, гистоструктура тонкой кишки, активность энтеральных олигосахаридаз

INTESTINAL CARBOHYDRATE DIGESTION IN RAT ALLOXAN DIABETES

[1]Kuchkarova L.S., [2]Rokhimova Sh.O.

[1]National University of Uzbekistan, Tashkent, e-mail: Lyuba.kuchkarova@mail.ru;
[2]Urgench branch of the Tashkent Medical Academy, Urgench, e-mail: Shirin2111@mail.ru

In experiments on outbred white rats, the effect of alloxan-induced diabetes on the weight of the body and small intestine, intestinal histostructure and on the final stage of carbohydrate hydrolysis of in the small intestine was revealed. Diabetes was caused by a single intraperitoneal injection of alloxan monohydrate (170 mg / kg). Only alloxan-treated rats with the level of glucose in the blood 3 times higher than in the control group were studied. It turned out that in rats with alloxan-induced diabetes, there was a decrease in body mass (by 23.1 %) and small intestine mass (by 23.6 %). In this case, a violation of the histological structure was manifested both in mucosa and in serosa of the small intestine wall. It was expressed in a decrease in the density of cells in intestinal muscle, submucosal and mucous layers cells. Alloxan-induced diabetes also caused mucosal edema, blood capillary filling, and desquamation of epithelial cells. In addition, on the 10th day after administration of alloxan monohydrate, there was an increase in the activity of intestinal membrane-bound disaccharidases in alloxan-induced diabetic rats. The activity of maltase, sucrase, and lactase in rats with alloxan-induced diabetes was 25.6 %, 47.2 %, and 84.6 % higher, respectively, in comparison with rats of the control group. Therefore, alloxan-induced diabetes leads to a decrease in the body and small intestine mass of rats, a violation of the histostructure of the small intestine wall as well as an increase in the specific activity of intestinal maltase, sucrase and lactase.

Keywords: alloxan-induced diabetes, glucose, insulin, C-peptide, histological structure of the small intestine, activity of enteric oligosaccharidases

В настоящее время внимание исследователей и практиков стала привлекать взаимосвязь между сахарным диабетом и патологией желудочно-кишечного тракта. Это связано с тем, что имеется патогенетическая связь сахарного диабета с практически всеми органами желудочно-кишечного тракта, от пищевода до толстой кишки. Так, при диабете отмечены кандидоз, пародонтоз, кариес в полости рта, снижение секреции ферментов и соляной кислоты в желудке, ослабление рефлекторных реакций пищевода, жировая инфильтрация и дискинезия желчного пузыря, а также ослабление моторики желудочно-кишечного тракта. В тонкой кишке также при сахарном диабете зарегистрированы атрофические процессы в слизистой оболочке, изменения кишечной микрофлоры, нарушение кишечного всасывания и т.д. [1, 2].

Несмотря на то, что кишечная энтеропатия встречается у многих пациентов с диабетом [1, 2], научно обоснованных сведений для понимания этиопатогенеза заболеваний тонкой кишки и целевой терапии для противодействия вредного влияния сахарного диабета на морфофункциональное состояние тонкой кишки недостаточно, что

требует более широких экспериментальных подходов. Исследование сдвигов кишечного пищеварения углеводов в тонкой кишке важно и потому, что кишечник играет весьма существенную роль в гомеостазе глюкозы, уровень которой при сахарном диабете в крови резко увеличивается [3]. Трудность понимания этиопатогенеза развития энтеральных патологий при диабете усугубляется и тем, что симптомы кишечной диабетической энтеропатии совпадают с другими симптомами кишечных нарушений или могут быть спутаны с побочными эффектами лекарств при лечении диабета [4]. Поэтому исследования гистоструктуры и особенностей гидролиза углеводов в тонкой кишке помогут пролить свет на развитие патологии кишечника, поспособствуют выбору адекватной комплексной терапии и предотвращению дальнейшего развития осложнений структурно-функциональных сдвигов тонкой кишки при сахарном диабете.

Цель исследования: изучить гистоструктуру тонкой кишки и активность энтеральных ферментов при аллоксан-индуцированном диабете крыс.

Материалы и методы исследования

В опытах были использованы белые беспородные крысы-самцы, массой 180–200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария, при комнатной температуре, естественном световом режиме и неограниченном доступе к воде и пище. Содержание, питание и уход за животными проводились согласно Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях [5].

Индукцию сахарного диабета вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана моногидрата (DIAEM, ООО, Москва) в дозе 170 мг/кг массы тела животного. В экспериментальные наблюдения включали только крыс с устойчивой гипергликемией, т.е. тех животных, у которых уровень глюкозы в крови после введения аллоксана моногидрата был более чем в 3 раза больше контрольных величин. Крыс контрольной группы инъецировали тем же способом и в то же время эквивалентным объёмом физиологического раствора.

Забой животных проводили всегда в одно и то же время между 9.00 и 10.00 утра. При декапитации животных кровь собирали в парафиновые центрифужные пробирки и отстраивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем пробы крови центрифугировали со скоростью 5000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант осторожно отсасывали для определения в нем уровня глюкозы.

Для гистологического исследования извлеченнную из брюшной полости крыс тонкую кишку очищали от жировой ткани и промывали 10 мл холодного раствора Рингера (pH = 7,4). Затем из медиальной части тонкой кишки вырезали отрезок длиною в 1 см, который фиксировали в 10% растворе формалина в течение не менее чем трех суток. Далее образцы для гистологического исследования тонкой кишки высушивали путем стандартной проводки по растворам с возрастающей концентрацией этилового спирта (70, 80, 96 и 100%) и заливали парафином. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5–6 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином. Препараты были сфотографированы световым цифровым микроскопом фирмы Лейка (DN-300M) (Германия).

Оставшиеся после взятия на анализ гистоструктуры части кишечника высушивали фильтровальной бумагой, взвешивали, разрезали вдоль органа и пластмассовым шпателем осторожно отделяли мукозу (слизистая и подслизистая оболочки) от серозы (соединительнотканный и мышечный слой). Мукозу тонкой кишки заливали раствором Рингера в отношении 1:9 и далее гомогенизировали тефлоновым пестиком при скорости 300 g в течение минуты. Все операции проводили на холоде.

В супернатанте тонкой кишки при соответствующих разведениях определяли активность щеточнокаёмных мальтазы (КФ 3.2.1.20), сахаразы (КФ.2.4.1.100) и лактазы (КФ 3.2.1.23). Определение активностей кишечных дисахаридаз, уровня глюкозы в сыворотке крови проводили глюкозооксидазным методом с использованием специальных наборов реактивов фирмы Human (Германия).

Полученные результаты были обработаны с определением коэффициента Стъюдента-t и показателя достоверности – P. В работе данные представлены как средняя ± ошибка средней (M ± m). При $P < 0,05$ различия в показателях между опытной и контрольной группами принимались за достоверные.

Результаты исследования и их обсуждение

Оказалось, что у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом содержание глюкозы в сыворотке крови, как и ожидалось, увеличивалось. Увеличение концентрации глюкозы у крыс опытной группы в крови было в в 3,3 раза больше на 5-й день и в 3,7 раз больше на 10-й день наблюдения по сравнению с крысами контрольной группы (рис. 1).

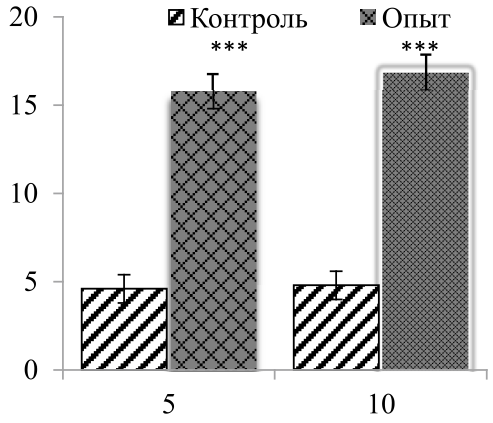


*Рис. 1. Уровень глюкозы (Ммоль/л) в крови при аллоксан-индуцированном диабете крыс-самцов (M ± m: при n = 6). По оси абсцисс – дни опыта; по оси ординат – концентрация глюкозы (Ммоль/л). *** –<0,001*

Аллоксан-индуцированный диабет оказывал заметное влияние и на массу тела, и на массу тонкой кишки крыс-самцов (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что масса тела и тонкой кишки у крыс контрольной группы на протяжении опыта регистрировалась на одном уровне. Однако у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом масса тела уменьшалась на 20,0 и 23,1% на 5-й и 10-й дни опыта соответственно по сравнению с контрольными величинами. Уменьшение было отмечено и в массе тонкой кишки. У крыс с аллоксан-индуцированным диабетом масса тонкой кишки на 5-й день наблюдения уменьшалась на 12,5%, а на 10-й день опытов – на 23,6% по сравнению с крысами контрольной группы.

Аллоксан-индуцированный диабет оказывал неоднозначное влияние и на уменьшение массы мукозы и серозы тонкой кишки крыс (табл. 2).

Так, масса мукозы на 5-й день эксперимента уменьшалась на 23,4%, а на 10-й день наблюдений на 26,1%. Масса серозы кишечника также уменьшалась, но это уменьшение было достоверным только на 10-й день наблюдения и составляло 19,8%. Следовательно, при аллоксан-индуцированном диабете уменьшение массы мукозы более выражено, чем уменьшение массы серозы тонкой кишки.

Изменение массы мукозы сопровождалось и сдвигами в гистоструктуре стенки тонкой кишки у аллоксан-индуцированных диабетических крыс (рис. 2).

Таблица 1

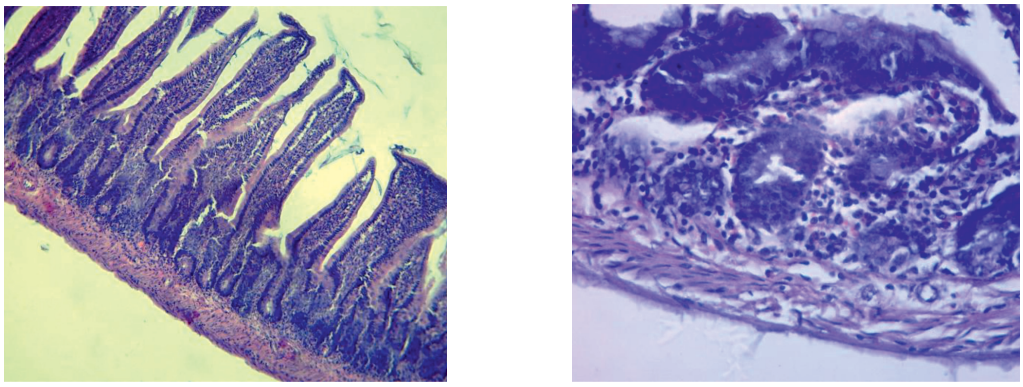
Масса тела (г) и масса тонкой кишки (г) при аллоксан-индуцированном диабете крыс-самцов (M ± m; n = 6)

Группы животных	Дни опыта					
	5-й			10-й		
	M ± m	%	P	M ± m	%	P
	Масса тела, г					
Контроль Опыт	215,6 ± 12,0 172,6 ± 8,5	100,0 80,0	– <0,01	218,5 ± 14,5 168,2 ± 12,4	100,0 76,9	– <0,02
	Масса тонкой кишки, г					
Контроль Опыт	6,4 ± 0,3 5,6 ± 0,1	100,0 87,5	– <0,02	7,2 ± 0,4 5,5 ± 0,1	100,0 76,4	– <0,001

Таблица 2

Масса серозы (г) и мукозы тонкой кишки (г) при аллоксан-индуцированном диабете крыс-самцов (M ± m; n = 6)

Группы животных	Дни опыта					
	5-й			10-й		
	M ± m	%	P	M ± m	%	P
	Масса серозы					
Контроль Опыт	3,98 ± 0,09 3,05 ± 0,12	100,0 76,6	– <0,001	4,42 ± 0,04 3,27 ± 0,07	100,0 73,9	– <0,001
	Масса мукозы					
Контроль Опыт	2,42 ± 0,03 2,35 ± 0,02	100,0 97,1	– >0,05	2,78 ± 0,02 2,43 ± 0,02	100,0 80,2	– <0,001



Контроль *Опыт*

Рис. 2. Гистоструктура тонкой кишки при аллоксан-индуцированном диабете у крыс-самцов (х 200, окраска – гематоксилин-эозин)

Таблица 3

Специфическая активность энтеральных дисахаридаз (мкмоль/мин/г ткани) при аллоксан-индуцированном диабете у крыс-самцов (M ± m; n = 6)

Группы животных	Дни опыта					
	5-й			10-й		
	M ± m	%	P	M ± m	%	P
	Мальтаза					
Контроль Опыт	72,6 + 5,2 89,8 + 6,8	100,0 123,7	– >0,05	75,4 + 6,4 94,7 + 7,3	100,0 125,6	– >0,1
	Сахараза					
Контроль Опыт	6,9 + 0,6 9,5 + 0,8	100,0 137,7	– <0,02	7,2 + 0,9 10,6 + 0,7	100,0 147,2	– <0,01
	Лактаза					
Контроль Опыт	1,1 + 0,06 1,9 + 0,04	100,0 172,7	– <0,001	1,3 + 0,05 2,4 + 0,09	100,0 184,6	– <0,001

Из рис. 2 видно, что в контрольной группе крыс ворсинки расположены паралельно, крипто-ворсиночные структуры четко дифференциируются, мышечные клетки плотно прилегают друг к другу и соединительной ткани. У крыс опытной группы явно проявляется «разрыхленность» мышечного, подслизистого и слизистого слоёв стенки тонкой кишки. Кроме того, у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом отмечается значительный отёк слизистой, десквамация кишечного эпителия, полнокровие капилляров собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы (рис. 2).

Как видно из табл. 3, на 5-й день опыта у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом по сравнению с крысами контрольной группы активность мальтазы увеличивалась на 23,7%, активность сахаразы – на 37,7%, а лактазы – на 72,7%. На 10-й день наблюдений у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом активность мальтазы, сахаразы и лактазы возрастала соответственно на 25,6; 47,2 и 84,6% по сравнению с крысами, получавшими физиологический раствор, т.е. активность всех кишечных мембраносвязанных дисахаридаз при аллоксановом диабете возрастала (табл. 3).

Таким образом, результаты исследований показывают, что аллоксан-индуцированный диабет вызывает серьёзные нарушения как в структуре, так и в функции тонкой кишки. Это проявляется в сдвигах гистоструктуры (отсутствие упорядоченности в расположении ворсинок и миоцитов, эдема слизистой, десквамация эпителия, наполнение капилляров) стенки тонкой кишки и индукции активности мембраносвязанных дисахаридаз.

Считают, что уменьшение массы тела и органов может быть связано с увеличением интенсивности процессов липолиза, протеолиза и гликогенолиза при сахарном диабете [6, 7]. Разрушающее действие аллоксан-индуцированного диабета и гипергликемии на структуры и ткани, в том числе и на гистоструктуру тонкой кишки, возможно, обусловлено усилением перекисного окисления липидов, в связи с увеличением активных

форм кислорода при сахарном диабете [8]. Тотальное нарушение упорядоченности гистоструктуры мукозы и серозы кишечника наряду с уменьшением массы кишечника, возможно, также является одной из причин уменьшения массы тела у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом, так как структурная целостность слизистой кишечника, участвующей в ассимиляции пластического и энергетического материала нарушается. Уменьшение же массы мукозы тонкой кишки приводит к сокращению общей гидролитической и транспортной поверхности тонкой кишки – основного органа, участвующего в гидролизе и всасывании нутриентов.

Было показано, что морфофенотип эпителиальных клеток ворсинок (объем ядра, количество, площадь и объем клеток) у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом мало изменяется [9]. Однако в наших исследованиях влияние экспериментального диабета на гистоструктуру тонкой кишки проявлялось в весьма значимой деструкции мышечной и слизистой оболочки кишечника (рис. 2). Возможно, что это связано с тем, что опытах была использована другая линия крыс и в рассматриваемой работе был вызван не стрептозотоциновый, а аллоксановый диабет, обладающий большей токсичностью и повреждающим действием на другие ткани [10].

Влияние аллоксан-индуцированного диабета кроме нарушения гистологической структуры тонкого кишечника отразилось также в изменении специфической активности пищеварительных дисахаридаз, что проявлялось в заметном увеличении активности мембраносвязанных мальтазы, сахаразы и лактазы тонкой кишки. Увеличение активности энтеральных дисахаридаз было отмечено также И. Мукарами и Т. Икеда при стрептозотоцин-индуцированном диабете и гипергликемии крыс. Однако при этом авторы не описали возможные механизмы индукции активности энтеральных дисахаридаз при сахарном диабете или гипергликемии [11].

Считаем, что, возможно, этот феномен обусловлен дефицитом содержания глюкозы в тканях. Несмотря на увеличенное содержание глюкозы в крови, ее уровень в тканях из-за подавления утилизации глюкозы при диабете понижен [3]. По принципу обратной связи «глюкозный голод» основной массы клеток организма, возможно, и приводит к повышению активностей кишечных дисахаридаз. Однако такое предположение нуждается в дополнительных экспериментальных доказательствах.

Экспериментальный аллоксан-индуцированный диабет, будучи диабетом 1-го типа, известно, вызывает существенные сдвиги в структуре и функции β-клеток поджелудочной железы. Возникшие дефицит инсулина и гипергликемия, в свою очередь, являются причиной и/или поводом для дисфункции органов желудочной-кишечного тракта и других функциональных систем [2, 10]. В данной работе выявлена деструкция гистоструктуры стенки тонкой кишки и индукции гидролитической способности энтероцитов, которая выражена в повышении активности кишечных энтеральных мембраносвязанных олигосахаридаз. Это обстоятельство говорит о том, что при выявлении этногенеза и лечении сахарного диабета 1-го типа, который в экспериментах индуцируется введением аллоксана, следует учитывать сопутствующие морфофункциональные сдвиги в тонкой кишке.

Выводы

1. Аллоксан-индуцированный диабет вызывает уменьшение массы тела и тонкого кишечника крыс, нарушение гистоструктуры стенки тонкой кишки.

2. При аллоксан-индуцированном диабете имеет место увеличение специфической активности кишечных мальтазы, сахаразы и лактазы.

Список литературы

1. Полунина Т.Е. Патология желудочно-кишечного тракта при сахарном диабете // Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология. 2011. № 5. С. 12–18.

2. Krishnan B., Babu S., Walker J., Walker A.B., Pappachan J.M. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. World journal of diabetes. 2013. V. 4. No. 3. P. 51–63.

3. Holst J.J., Gribble F., Horowitz M,. Rayner C.K. Roles of the gut in glucose homeostasis diabetes care. 2016. V. 39. P. 884–892.

4. Krishnasamy S., Abell T.L. Diabetic gastroparesis: principles and current trends in management. Diabetes therapy. 2018. V. 9. № 1. P. 1–42.

5. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) 31.08.2005. [Электронный ресурс]. URL: http://docs.cntd.ru/document/901909691 (дата обращения: 29.06.2020).

6. Ewenighi C., Dimkpa U., Onyeanusi J., Onoh L., Onoh G., Ezeugwu U. Estimation of glucose level and body weight in alloxan induced diabetic rat treated with aqueous extract of Garcinia kola seed. Ulutas medical journal. 2015. V. 1. No. 2. P. 26–30.

7. Mottalib A., Kasetty M., Jessica Y., Mar J.Y., Elseady T., Ashrafzadeh S., Hamdy O. Weight management in patients with type 1 diabetes and obesity. Current diabetes reports. 2017. V. 10. P. 92.

8. Ullah A., Khan A., Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal. 2016. V. 24. P. 547–553.

9. Zoubi S.A., Mayhew T.M., Sparrow R.A. The small intestine in experimental diabetes: cellular adaptation in crypts and villi at different longitudinal sites. Virchows archiv. 1995. V. 426. No. 5. P. 501–507.

10. Ярмолинская М.И., Андреева Н.Ю., Абашова Е.И., Мишарина Е.В. Экспериментальные модели сахарного диабета 1-го типа // Журнал акушерства и женских болезней. 2019. Т. 68. № 2. С. 109–118.

11. Murakami I., Ikeda T. Effects of diabetes and hyperglycemia on disaccharidase activities in the rat. Scandinavian journal of gastroenterology. 1998. V. 33. № 10. P. 1069–1073.