

*На правах рукописи*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД  
ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ  
РАБОТЫ

ВЛИЯНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2 НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ  
ПОКАЗАТЕЛИ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫ

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре  
по направлению подготовки кадров высшей квалификации  
06.06.01 Биологические науки  
Специальность 03.03.01 – физиология

Аспирант: Полозов Александр Сергеевич  
Научный руководитель: Громова Людмила Викторовна, д.б.н.  
Лаборатория физиологии питания

Санкт-Петербург  
2021

Оглавление:

Актуальность темы исследования.....	3
Цель и задачи исследования .....	5
Научная новизна .....	6
Теоретическая и практическая значимость .....	6
Материалы и методы .....	7
Результаты и их обсуждение. ....	8
Выводы .....	18
Апробация работы .....	18
Список литературы .....	20

## **Актуальность темы исследования**

Диабет типа 2 - хроническое метаболическое заболевание, распространённость которого в мире в последние десятилетия существенно увеличивается. Этим определяется актуальность исследования изменений всасывания глюкозы в тонкой кишке (включая молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса) и мембранных пищеварительных ферментов, играющих важную роль в общем и углеводном обмене при диабете типа 2.

Известно, что хроническая гипергликемия при диабете типа 2 обусловлена комбинированным действием двух факторов: резистентностью тканей (печень, мышцы, жировая ткань) к инсулину и сниженной секрецией этого гормона (Baud et al., 2016; Khawandanah, 2019). Вместе с тем, при диабете типов 1 и 2 наблюдается повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке (Baud G et al., 2016; Song P. et al., 2016; Lehmann A. et al., 2016), которое тоже вносит заметный вклад в формирование гипергликемии.

В последние годы проводились широкие исследования в отношении оценки роли различных механизмов всасывания глюкозы в тонкой кишке млекопитающих. В итоге, большинство исследователей согласились с тем, что в нормальных условиях глюкоза переносится через кишечный эпителий в основном посредством активного транспорта через апикальную мембрану энтероцитов с участием транспортёров SGLT1 (Reviews: Hopfer, 1987; Ferraris 2001; Kellett, 2001; Wright et al., 2007, 2017; Kellett et al., 2008; Shirazi-Beechy et al, 2011; Scow et al., 2011; Koepsell, 2017, 2020; Elferink et al, 2020; Merino et al., 2020; Wu et al., 2020). При этом её выход из энтероцитов осуществляется путём облегчённой диффузии через базолатеральную мембрану с участием транспортёров GLUT2. Вместе с тем, в случае повышенных концентраций глюкозы в кишечной полости определённый вклад в процесс её всасывания может вносить также облегчённая диффузия глюкозы через апикальную мембрану энтероцитов с участием транспортёров GLUT2, которые способны быстро встраиваться в эту мембрану в данных условиях. Аналогичная схема событий при всасывании глюкозы в тонкой кишке, по-видимому, имеет место и при диабете типа 2. Однако, в этом случае результаты исследований разных авторов в отношении реакции на диабет типа 2 со стороны транспортёров GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов остаются весьма противоречивыми (Gouyon et al., 2003; Tobin et al., 2008; Ait-Omar et al., 2011). Выяснение вопроса о роли различных механизмов всасывания глюкозы в тонкой кишке при диабете типа 2 позволит выявить новые возможности для эффективной коррекции уровня глюкозы в крови при данном состоянии.

В ряде работ сообщается о повышении активности кишечных дисахаридаз при диабете типа 1, что в определённых условиях может оказывать влияние на скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке и вносить вклад в формирование гипергликемии (Dyer et al., 2002; Liu et al., 2011). Однако данных, касающихся исследования этого вопроса при диабете типа 2, в литературе очень мало.

Известно, что высокожировая диета (ВЖД) вызывает метаболическую эндотоксинемию у человека и животных (Kaliannan K. et al., 2013). Предполагается, что такое состояние обусловлено повышенным переносом через кишечный эпителий во внутреннюю среду организма бактериального токсина – липополисахарида (ЛПС) – компонента мембран грамм-отрицательных бактерий (Kaliannan K. et al., 2013). Кроме того, показано, что ВЖД вызывает локальное воспаление кишечника (Chao L.C. et al., 2009). Системное и локальное воспаления приводят к повышенной экспрессии провоспалительных цитокинов, что способствует ещё большей проницаемости кишечника и транслокации токсинов во внутреннюю среду организма (Kaliannan K. et al., 2013). В ряде работ приводятся данные об участии кишечной щелочной фосфатазы (КЩФ) в детоксикации бактериальных токсинов, включая ЛПС (Kaliannan K. et al., 2013; Chao L.C. et al., 2009; Chen K.T. et al., 2010; Lassenius M.I. et al., 2017; Malo M.S. et al., 2016). Кроме того, установлено, что пероральное применение экзогенной кишечной щелочной фосфатазы (КЩФ) снижает эндотоксинемию, индуцированную ВЖД, и предотвращает метаболический синдром у мышей (Kaliannan K. et al., 2013; Malo M.S. et al., 2016). В некоторых работах сообщается о снижении активности КЩФ в фекалиях у животных (Kaliannan K. et al., 2013; Lassenius M.I. et al., 2017; Malo M.S. et al., 2016) и в кале у человека при сахарном диабете (Lassenius M.I. et al., 2017; Malo M.S. et al., 2016). По мнению авторов этих работ, данный факт может свидетельствовать о высоком риске развития воспалительного процесса в кишечнике при диабете типов 1 и 2.

В доступной литературе практически нет информации о реакции на диабет типа 2 со стороны ещё одного ключевого кишечного мембранного фермента – аминокептидазы N, которая, помимо участия в пищеварении (заключительные стадии гидролиза белков), выполняет также другие важные функции (вовлечена в транспорт холестерина, иммунные ответы и презентацию антигенов в энтероцитах) (Уголев А.М., 1986; Hansen G.H. et al., 2007; Kramer W. et al., 2005; Lalles J.P. et al., 2012; Cong Y. et al., 2015; Santiago C. et al., 2017).

В последние годы в ряде работ [Joshi et al., 2017; Fujiwara et al., 2020; Park et al., 2020; Zheng et al., 2020] сообщается о способности некоторых пробиотических

молочнокислых бактерий снижать гликемию у экспериментальных животных после приёма пищи в нормальных условиях, а также при диабете типа 2. Этот факт обуславливает актуальность дальнейших исследований по выявлению аналогичного действия у других видов бактерий, близких к молочнокислым по метаболическим показателям.

### **Цель и задачи исследования:**

Цель работы – исследовать изменения всасывания глюкозы, транспортёров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах, структурных показателей тонкой кишки и активности ключевых ферментов, реализующих мембранное пищеварение, при экспериментальном диабете 2-го типа у крыс, а также оценить особенности коррекции перечисленных показателей с применением метформина и пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3.

#### Задачи:

1. Исследовать изменения всасывания глюкозы в тонкой кишке, содержания транспортёров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов, структурных показателей тонкой кишки и активности ключевых мембранных пищеварительных ферментов через 3 недели после индукции экспериментального диабета типа 2 у крыс. В этих условиях верифицировать диабет типа 2 у животных, используя оральный глюкозотолерантный (ОГТТ) и инсулинотолерантный тесты (ИТТ).

2. Исследовать изменения всасывание глюкозы в тонкой кишке, содержания транспортёров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов, структурных показателей тонкой кишки и активности ключевых мембранных пищеварительных ферментов на отдалённых сроках (через 9 недель) после индукции экспериментального диабета типа 2 у крыс. В этих условиях верифицировать диабет типа 2 у животных, используя тесты ОГТТ и ИТТ.

3. При введении крысам с экспериментальным диабетом типа 2 метформина и пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 в течение 5 недель исследовать изменения всасывания глюкозы в тонкой кишке и активности ключевых мембранных пищеварительных ферментов. В ходе опытов контролировать у животных уровень гликемии и чувствительность к инсулину, используя тесты ОГТТ и ИТТ.

## **Научная новизна**

В опытах на крысах впервые в условиях, максимально близких к физиологическим (опыты *in vivo* в отсутствие наркоза и оперативных вмешательств), показано повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке при экспериментальном диабете типа 2. Это повышение, по-видимому, обеспечивается увеличением численности энтероцитов с более высоким содержанием транспортеров SGLT1 в их апикальной мембране.

Установлено, что изменения всасывания глюкозы в тонкой кишке и активности мембранных пищеварительных ферментов при экспериментальном диабете типа 2 у крыс зависят от времени, прошедшего после индукции у животных этого состояния; характер изменения активности конкретного фермента определяется его функциональной ролью в пищеварении и защите против антигенов. На примере данных об изменении активностей щелочной фосфатазы и аминопептидазы N на разных сроках после индукции диабета типа 2 показано, что высокий риск развития воспалительного процесса в кишечнике характерен для животных с длительным пребыванием в состоянии диабета типа 2.

Получены новые данные об эффективности и специфических особенностях действия метформина и пробиотического штамма *Enterococcus faecium* L3 в отношении коррекции всасывания глюкозы в тонкой кишке и активности мембранных пищеварительных ферментов в слизистой оболочке кишечника и в его химусе у крыс после изменений, вызванных экспериментальным диабетом типа 2.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты расширяют существующие представления об адаптации пищеварительной системы к диабету типа 2, описывая изменения всасывания глюкозы в тонкой кишке, транспортёров глюкозы SGLT1 и GLUT2, структурных показателей тонкой кишки и активности ключевых кишечных мембранных пищеварительных ферментов к данному состоянию.

В прикладном аспекте полученные результаты способствуют пониманию процессов, которые могут иметь место в кишечнике при назначении метформина или пробиотиков в лечебных целях больным с диабетом типа 2. Они также дополняют имеющиеся сведения об эффективности штамма *Enterococcus faecium* L3 в коррекции функциональных изменений в кишечнике, вызванных диабетом типа 2.

## Материалы и методы исследования.

В опытах использованы крысы (Вистар, самцы), полученные из ЦКП Биокolleкция ИФ РАН. Возраст животных до начала экспериментального периода составлял 3-4 мес. (масса тела 180–200 г). Опыты проводились в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с животными.

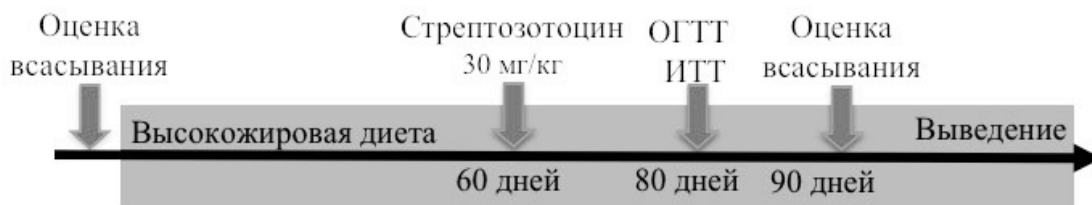


Рис. 1. Схема эксперимента.

По оси абсцисс – продолжительность эксперимента начиная с перевода опытной группы на высокожировую диету.

До индукции диабета типа 2 опытные группы животных содержались в течение 2-х месяцев на высокожировой диете (20% белка, 22% жира, 25.4% крахмала и 1.83% сахарозы, в % от влажного веса), а контрольные группы - на стандартной и (или) высокожировой.

Всасывание глюкозы в тонкой кишке определялось у животных после их предварительного голодания (18–20 ч), анализируя скорость свободного потребления ими 20% раствора глюкозы (Груздков А.А. с соавт., 2015).

Перед индукцией диабета у животных определялись исходные скорости всасывания глюкозы (мкмоль/мин) и формировались группы: опытные (n = 10 в каждой группе) и контрольные (n=8 в каждой группе) с близкими средними значениями этих скоростей. Диабет типа 2 в опытных группах вызывали введением стрептозотоцина (в/б, доза 30 мг/кг). При тех же условиях контрольным животным вместо стрептозотоцина вводили растворитель препарата - цитратный буфер (pH 4.5).

Через 10 дней после введения указанных веществ животных проверяли на толерантность к глюкозе, используя оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ). В ходе ОГТТ уровень глюкозы в крови определяли после голодания животных в течение 18 ч, а затем после перорального введения животным глюкозы в дозе 2 г/кг массы тела через каждые 30 мин в течение 2-х часов. На основании этих результатов выделялись животные с выраженными признаками диабета (с уровнем гликемии по

интегральному показателю (площадь под глюкозной кривой в тесте ОГТТ)  $> 13$  мМоль/л\*ч), которые в дальнейшем использовались в экспериментах.

Введение пробиотика *Enterococcus faecium* L3 (в дозе  $7^{10}$  КОЕ на животное) и метформина (в дозе 60 мг на животное) осуществлялось внутривентриально, с помощью зонда, ежедневно, утром. Контрольной группе вводилась вода.

Инсулинотолерантный тест (ИТТ) проводили по следующей схеме: после голодания в течении ночи крысам вводился инсулин Хумалог (п/к, 0.75 МЕ/кг). Содержание глюкозы в крови измерялось до инъекции инсулина (точка 0) и через 30, 60 мин после его инъекции.

В конце опытов, после декапитации животных, отбирали пробы ткани из середины тощей кишки для морфометрического анализа (число энтероцитов на ворсинках) с помощью световой микроскопии и для иммуногистохимического анализа транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах с использованием конфокальной микроскопии (Грефнер и др., 2015). В случае иммуногистохимического анализа анализировались энтероциты, расположенные в верхней и средней третях кишечных ворсинок. Содержание транспортёров SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов оценивалось полуколичественным способом путём измерения с использованием программы Image J интенсивности иммунофлюоресценции меток к транспортёрам на полосках фиксированной длины и ширины, покрывающих апикальную мембрану.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Достоверными считались различия при  $P < 0.05$ .

## **Результаты и их обсуждение.**

### **1. Влияние диабета типа 2 на функциональные и структурные показатели кишечника крыс**

**Оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ).** При экспериментальном диабете типа 2, у крыс через 3 недели после его индукции наблюдалось повышение уровня глюкозы в крови на 30-й, 60- и 120-мин теста ОГТТ по сравнению таковыми у контрольных животных, содержащихся на жировой диете (рис. 2). Этот факт подтвердил наличие диабета у экспериментальных животных в наших опытах.



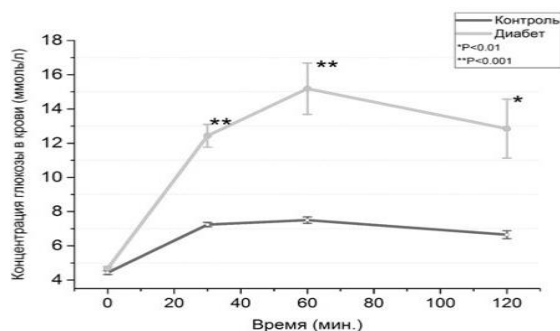


Рис. 2. Оральный глюкозотолерантный тест. А – гликемическая кривая.

**Инсулинотолерантный тест (ИТТ).** После введение инсулина (п/к, 0.75 ед/кг), через 30 и 60 мин в группах с диабетом и в контроле (без диабета) наблюдалось снижение уровня глюкозы в крови по сравнению с исходным уровнем (точка 0). Это снижение было менее выраженным в группе с диабетом типа 2, чем в контрольной группе (на 51 и 32% против 87 и 61% через 30 и 60 мин, соответственно). Данный факт подтвердил наличие инсулинорезистентности у животных с диабетом типа 2 в наших опытах.

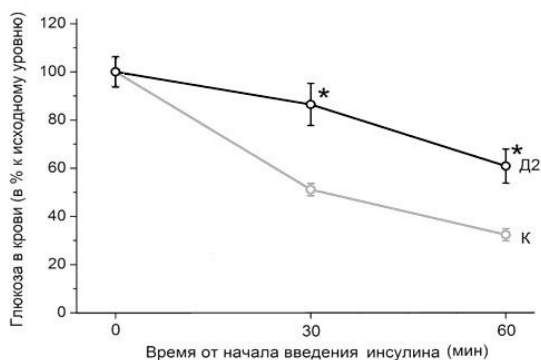


Рис. 3. Инсулинотолерантный тест. К – контрольная группа; Д2 – сахарный диабет типа 2.

**Всасывание глюкозы.** Через 3 нед. после введения стрептозотоцина скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке у крыс с диабетом типа 2 увеличилась на 38% по сравнению с контролем (рис. 3 А).

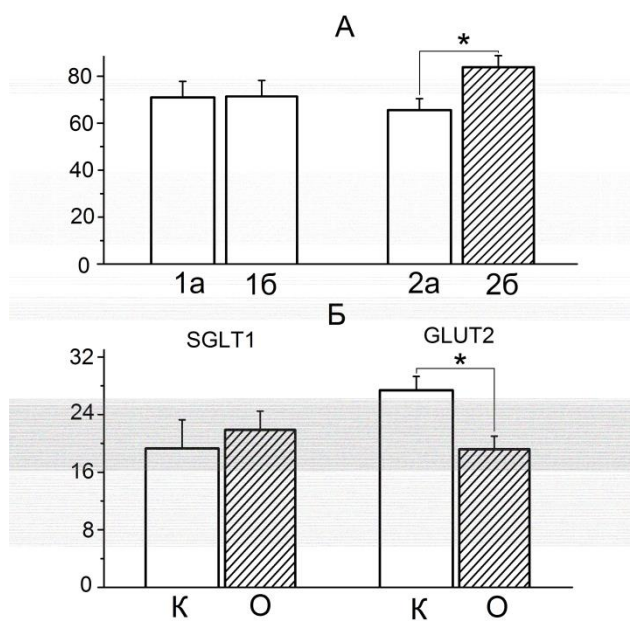


Рис. 3. Скорость всасывания глюкозы (мкмоль/мин) в тонкой кишке крыс и содержание транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 апикальной мемbrane энтероцитов (усл. ед.) при диабете типа 2 и в контроле. А: 2а и 2б – в контроле и в группе с диабетом типа 2; 1а и 2а – исходные уровни всасывания глюкозы в этих группах до индукции диабета типа 2.

Этот результат хорошо согласовался с данными других авторов, которые показывают повышенный уровень всасывания глюкозы в тонкой кишке при диабете типов 1 или 2 в острых опытах *in vivo* или *in vitro* (обзоры: Baud G et al., 2016; Song P. et al., 2016; Lehmann A. et al., 2016).

При исследовании содержания транспортеров глюкозы в апикальной мемbrane энтероцитов мы наблюдали тенденцию к повышению содержания транспортера SGLT1 в этой мемbrane в группе с диабетом по сравнению с контролем (на 42.8%, однако  $P > 0.05$ ) (рис. 3 Б). Однако, в случае транспортера GLUT2, у крыс с диабетом имело место снижение содержания этого транспортера в апикальной мемbrane энтероцитов по сравнению с контролем (на 30%,  $P < 0.05$ ) (рис. 3 Б и 4).

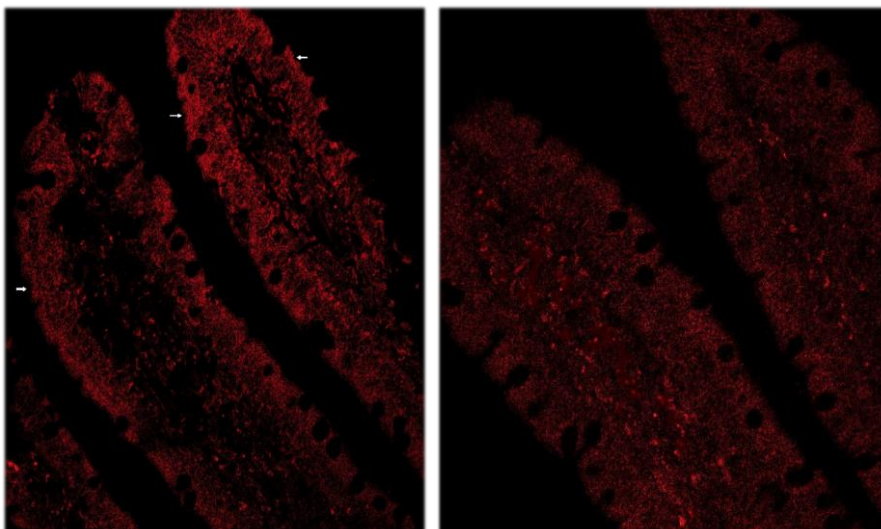


Рис. 4. Фотографии кишечных ворсинок, отражающие локализацию и интенсивность меток в транспортёрам GLUT2 в энтероцитах тощей кишки у крыс с диабетом типа 2 (слева) и в контроле (справа).

**Морфологические показатели.** В группе с диабетом в тощей кишке было выявлено повышение количества энтероцитов (Рис.5.) на продольный срез ворсинки ( $112.54 \pm 3.96$  при диабете против  $94.71 \pm 2.51$  в контроле,  $P < 0.01$ ), а в подвздошной кишке наблюдалась тенденцию к увеличению данного показателя ( $93.3 \pm 7.46$  при диабете и  $77.3 \pm 4.94$  в контроле). В подвздошной кишке отмечалось также повышение количества бокаловидных клеток на продольном срезе ворсинок по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ , рис. 5).

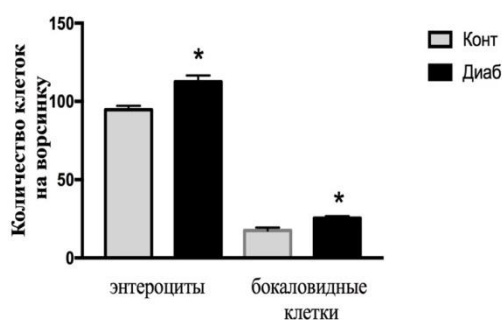


Рис. 5. Морфологические показатели тощей и подвздошной кишки. По вертикали - количество клеток на ворсинку, по горизонтали - энтероциты в тощей кишке, бокаловидные клетки в подвздошной кишке. \*  $p < 0.05$ .

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при экспериментальном диабете типа 2 в данных опытах может быть обусловлено увеличением в ней количества энтероцитов на ворсинках с более высоким содержанием транспортёра глюкозы SGLT1.

**Активности мембранных пищеварительных ферментов.** При диабете типа 2 были повышены активности мальтазы в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, щелочной фосфатазы (ЩФ) в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки, химусе тощей и толстой кишки, а также аминопептидазы N (АП-N) в слизистой оболочке и химусе тонкой кишки (рис. 6).

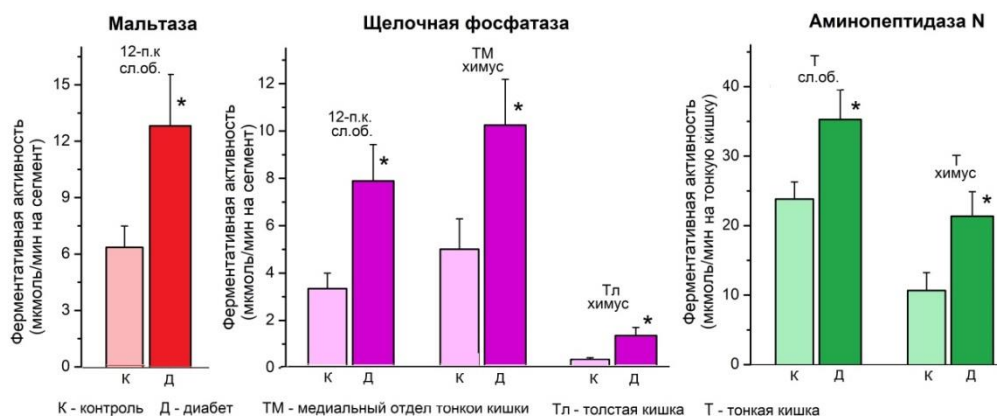


Рис. 6. Влияние экспериментального диабета типа 2 у крыс на активность мембранных пищеварительных ферментов в слизистой оболочке и химусе кишечника.

12-п.к. – двенадцатиперстная кишка, сл. об. – слизистая оболочка. По вертикали: активность ферментов в мкмоль/мин на участок тонкой кишки. \* $P < 0.05$  по отношению к соответствующему контролю.

Наши данные в отношении повышения активности мальтазы согласуются с результатами, других авторов, наблюдавших повышение активности дисахаридаз в двенадцатиперстной кишке у больных с диабетом типа 1 и у животных с экспериментальным диабетом типа 1, вызванным введением стрептозотоцина [Liu et al., 2011]. В случае ЩФ наши результаты позволяют предположить, что повышение активности данного фермента в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки и в химусе тонкой и толстой кишки, по-видимому, связано с нарушением кишечной микробиоты и, как следствие, с увеличением в ней условнопатогенных бактерий, содержащих бактериальный токсин липополисахарид (ЛПС), в детоксикации которого ЩФ успешно участвует.

В случае АП-N наши результаты пока трудно однозначно интерпретировать. Однако учитывая данные литературы о том, что этот фермент является мишенью для коронавирусов [Cong et al., 2015], можно предположить, что у животных с диабетом типа 2 повышен риск развития воспалительного процесса в кишечнике.

## 2. Влияние диабета типа 2 на функциональные и структурные показатели кишечника крыс при отдалённых сроках после индукции этого состояния

**Всасывание глюкозы, транспортёры глюкозы в энтероцитах, морфологические показатели.** В данных экспериментах скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке у крыс с диабетом была повышена (по сравнению с контролем) на 20% ( $P < 0.05$ ) через 6 недель и на 27% ( $P < 0.02$ ) через 9 недель после индукции диабета типа 2 (рис. 2). Эти результаты показывают усиление реакции системы всасывания глюкозы в тонкой кишке на диабет типа 2 при увеличении срока после индукции данного состояния.

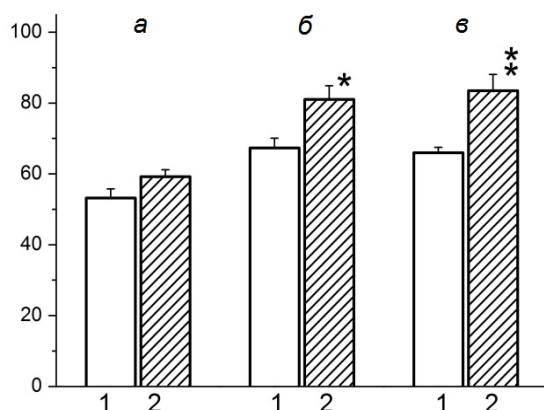


Рис. 7. Скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке у крыс с экспериментальным диабетом типа 2 и в контроле в разные сроки после индукции диабета типа 2.

По вертикали: скорость всасывания глюкозы, мкмоль/мин. Обозначения: 1 – контроль, 2 – диабет типа 2; а – исходный уровень, б и в – через 6 и 9 недель после индукции диабета. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$  по сравнению с контролем.

При анализе транспортёров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тощей кишки мы не обнаружили заметных изменений в их содержании в апикальной мембране по сравнению с контролем (рис. 8).

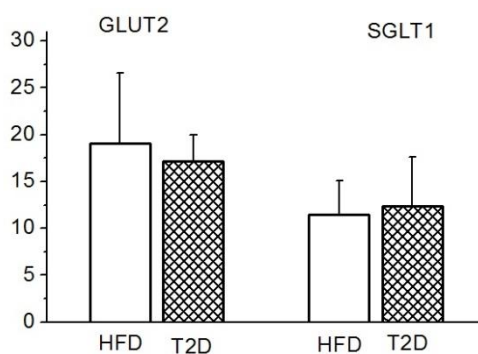


Рис. 8. Содержание транспортёров SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки при экспериментальном диабете типа 2 (T2D) и в контроле (HFD). По вертикали: интенсивность метки к транспортёрам SGLT1 и GLUT2 (усл. ед.).

При морфологическом анализе срезов тощей и подвздошной кишки у крыс с диабетом типа 2 отмечалось изменений в содержании энтероцитов на продольный срез ворсинки. Возможно, эти два факта связаны с тем, что в данных экспериментальных условиях в группе с диабетом типа 2 имели место меньшие уровни гипергликемии, чем в нашем предшествующем исследовании (интегральный показатель гликемии в данном исследовании составлял: 22,8 – 24,6 ммоль/л\*ч., а в предшествующем: 29,1 – 57,7 ммоль/л\*ч).

В связи с этим можно предположить, что повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при диабете типа 2 в данных опытах обеспечивается за счёт усиления активного транспорта глюкозы с участием SGLT1 вследствие повышения активности  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы в базолатеральной мембране энтероцитов, что в итоге способствует увеличению градиента ионов  $\text{Na}^+$  через апикальную мембрану энтероцитов. Нельзя исключить также того, что повышенное всасывания глюкозы при диабете типа 2 в данном случае может быть частично связано с увеличением пассивной проницаемости слизистой оболочки тонкой кишки. Правомерность такого предположения, в частности, подкрепляется данными настоящей работы о наличии тенденции к повышению всасывания маннита (маркер пассивной проницаемости кишечного эпителия), а также результатами других авторов, свидетельствующих о повышении пассивной проницаемости кишечника под влиянием диабета 1 и 2 (Mu et al., 2017; Paray et al, 2020).

**Активности мембранных пищеварительных ферментов.** При экспериментальном диабете типа 2 активности щелочной фосфатазы и аминопептидазы N были увеличены в слизистой оболочке двенадцатиперстной и толстой кишки, но снижены в химусе толстой кишки по сравнению с контролем (жировая дёта) (рис. 9 и 10). Наши данные в отношении снижения ЩФ в химусе толстой кишки хорошо согласуется с результатами других авторов, которые показывают снижение активности данного фермента в фекалиях у животных и в кале у человека при сахарном диабете (Kaliannan K. et al., 2013; Malo M.S. et al., 2016; Lassenius M.I. et al., 2017). Этот факт может указывать на повышенный риск развития воспалительного процесса в кишечнике при сахарном диабете типа 2.

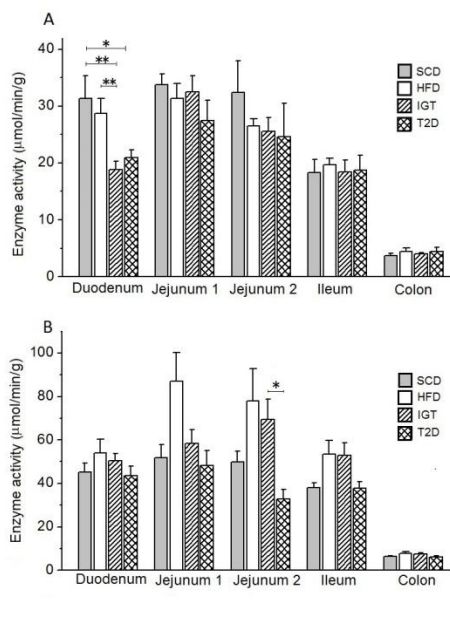


Рис. 9. Активности щелочной фосфатазы (А) и аминопептидазы N (В) в слизистой оболочке кишечника у крыс с экспериментальным диабетом типа 2, нарушением толерантности к глюкозе и в контролях (стандартная и жировая диеты). По вертикали: активность, мкмоль/мин/г. Обозначения: SCD – контроль (стандартная диета), HFD – контроль (высокожировая диета), IGT – нарушение толерантности к глюкозе, T2D – диабет типа 2; Jejunum 1 – проксимальный участок тощей кишки, Jejunum 2 – дистальный участок тощей кишки; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

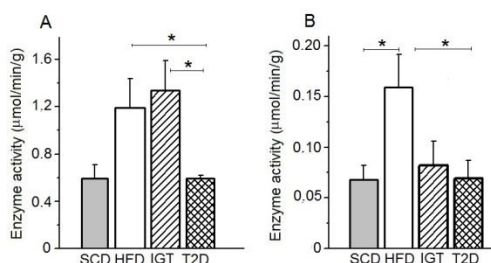


Рис. 10. Активности щелочной фосфатазы (А) и аминопептидазы N (В) в химусе толстой кишки крыс при экспериментальном диабете типа 2, нарушении толерантности к глюкозе и в контролях (стандартная и жировая диеты). По вертикали: активность, мкмоль/мин/г. Обозначения: SCD – контроль (стандартная диета), HFD – контроль (высокожировая диета), IGT – нарушение толерантности к глюкозе, T2D – диабет типа 2; Jejunum 1 – проксимальный участок тощей кишки, Jejunum 2 – дистальный участок тощей кишки; \*  $p < 0.05$ .

Сравнение результатов об изменении активности щелочной фосфатазы в химусе толстой кишки в первой и второй сериях опытов позволяет заключить, что высокий риск развития воспалительного процесса в кишечнике крыс проявляется на отдалённых сроках (более 9 нед.) после индукции диабета типа 2.

### 3. Влияние метформина и пробиотика *Enterococcus faecium* L3 на функциональные показатели кишечника у крыс экспериментальным диабетом типа 2

**Результаты ОГТТ и ИТТ.** Введение пробиотика в течение 5 нед. (группа Д2+Проб) сопровождалось тенденцией к снижению уровня гипергликемии в тесте ОГТТ по сравнению с группами Д2 (диабет типа 2, без препарата) и Д2+Мф (диабет типа 2 + метформин) и тенденцией к повышению чувствительности к инсулину по сравнению с группой Д2.

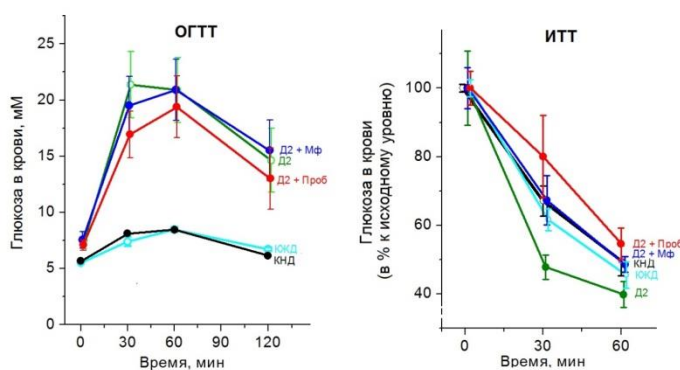


Рис. 11. Результаты тестов ОГТТ и ИТТ после введения метформина и пробиотика *Enterococcus faecium* L3 крысам с экспериментальным диабетом типа 2.

Обозначения: группа Д2 - без применения препаратов при диабете, группа Д2+Мф – с применением метформина при диабете, группа Д2+Проб – с применением пробиотика *Enterococcus faecium* L3 при диабете, группа КЖД – контроль, жировая диета и группа КНД – контроль, стандартная диета.

**Всасывание глюкозы.** Под влиянием метформина и пробиотика *E. faecium* L3 у животных наблюдался более низкий уровень всасывания глюкозы по сравнению с группой Д2. Это различие усилилось в конце опытов.

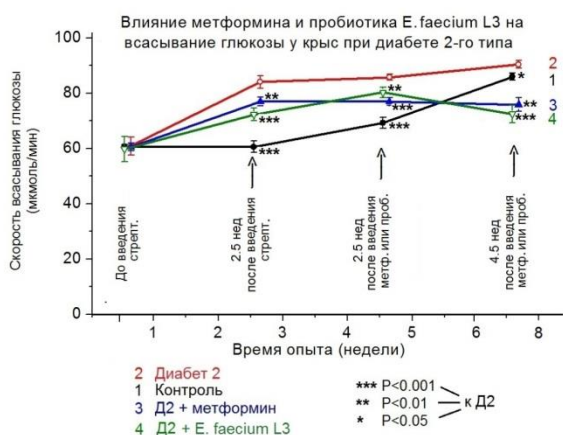


Рис. 12. Скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке после введения метформина и пробиотика *Enterococcus faecium* L3 крысам с экспериментальным диабетом типа 2.



Обозначения: группа Д2 - без применения препаратов при диабете, группа Д2+Мф – с применением метформина при диабете, группа Д2+Проб – с применением пробиотика *Enterococcus faecium* L3 при диабете, группа КЖД – контроль, жировая диета и группа КНД – контроль, стандартная диета.

**Активности мембранных пищеварительных ферментов.** Введение метформина животным с экспериментальным диабетом типа 2 в течение 5 недель вызывало снижение активности глюкоамилазы в слизистой оболочке тощей кишки по сравнению с группой КСД. В отличие от метформина, введение пробиотика таким же животным по той же схеме приводило к заметным изменениям активности нескольких ферментов: снижению активности глюкоамилазы в слизистой оболочке проксимальных отделов тонкой кишки (по сравнению с гр. КСД) и мальтазы (по сравнению с гр. КСД и КЖД), и повышению активности аминопептидазы N (АП-N) в дистальном отделе тощей кишки и в подвздошной кишке (по сравнению с гр. КСД и КЖД) (рис. 13). В итоге, в группе с пробиотиком было снижено, по сравнению с группой с метформином, отношение активности ЩФ к активности АП-N, которое может служить маркером противовоспалительного процесса в кишечнике (Lalles et al., 2012).

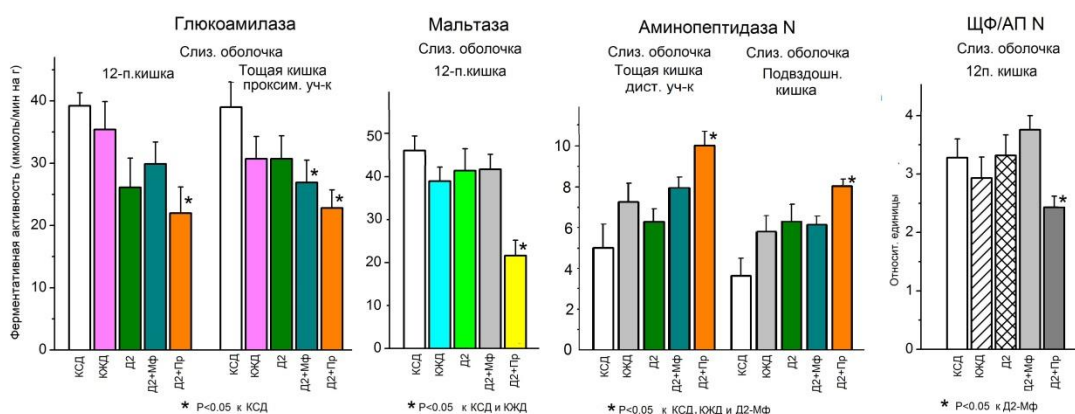


Рис. 13. Влияние метформина и пробиотика *Enterococcus faecium* L3 на активности мембранных пищеварительных ферментов и маркер противовоспалительного процесса в слизистой оболочке кишечника (отношение активности ЩФ к активности АП-N) при экспериментальном диабете типа 2 у крыс.

Обозначения: группа Д2 - без применения препаратов при диабете, группа Д2+Мф – с применением метформина при диабете, группа Д2+Проб – с применением пробиотика *Enterococcus faecium* L3 при диабете, группа КЖД – контроль, жировая диета и группа КНД – контроль, стандартная диета.

Таким образом, в отличие от метформина, введение пробиотика *Enterococcus faecium* L3 крысам с диабетом типа 2 способствует улучшению гомеостаза глюкозы в организме, что обеспечивается, по-видимому, за счет снижения всасывания глюкозы в тонкой кишке и ингибирования активностей кишечных глюкозидаз (глюкоамилаза, мальтаза). Однако, по сравнению с метформином, пробиотик *Enterococcus faecium* L3

вызывает повышение активности аминопептидазы N в тонкой кишке, что может способствовать увеличению риска развития воспалительного процесса в кишечнике.

### **Выводы**

1. В опытах на крысах впервые в условиях, максимально близких к физиологическим (опыты *in vivo* в отсутствие наркоза и оперативных вмешательств), показано повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке при экспериментальном диабете типа 2. Это повышение, по-видимому, обеспечивается увеличением численности энтероцитов с более высоким содержанием транспортера SGLT1 в их апикальной мембране.

2. Изменения всасывания глюкозы в тонкой кишке и активности мембранных пищеварительных ферментов при экспериментальном диабете типа 2 у крыс зависят от времени, прошедшего после индукции этого состояния; характер изменения активности конкретного фермента зависит также от его роли в пищеварении и защите против антигенов.

3. На отдалённых сроках после индукции диабета типа 2 наблюдается снижение активностей щелочной фосфатазы и аминопептидазы N в химусе толстой кишки, что может указывать на высокий риск развития в этих условиях воспалительного процесса в кишечнике.

4. Введение крысам с экспериментальным диабетом типа 2 пробиотика *Enterococcus faecium* L3, но не метформина, в течение 5 недель способствует улучшению гомеостаза глюкозы в организме, что обеспечивается, по-видимому, за счет снижения всасывания глюкозы в тонкой кишке и ингибирования активностей кишечных глюкозидаз (глюкоамилаза, мальтаза). Однако, по сравнению с метформином, применение пробиотика *Enterococcus faecium* L3 вызывает повышение активности аминопептидазы N в тонкой кишке, что может свидетельствовать о высоком риске развития воспалительного процесса в кишечнике.

### **Апробация работы.**

Результаты работы были представлены на Всероссийском симпозиуме с международным участием «Стресс: физиологические эффекты, патологические последствия и способы их предотвращения» (Санкт-Петербург, 2017); Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018); Гастрофоруме (Санкт-Петербург, 2018); 4th International Conference of the Veterinary Medicine Students (Poland,

Warsaw, 2018); Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2018» (Москва, 2018); VIII Российском научно-практическом конгрессе «Метаболический синдром. Фундаментальные и клинические аспекты - от теории к практике» (Санкт-Петербург, 2018); Научном форуме, посвященном 100-летию со дня рождения академика О.Г. Газенко / XVII Конф. по космич. биологии и авиакосмической медицине с международным участием (Москва, 2018); XX Международном конгрессе «Здоровье образование в ххi веке» (Москва, 2018); XV Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2019); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2019); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2020); XVI международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2020); Международной научно-теоретической конференции «Продовольственная безопасность: Национальные и глобальные факторы» (онлайн, 2020); XXIV Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье.» (онлайн, 2021).

#### **Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Груздков А.А., Дмитриева Ю.В., Алексеева А.С., Полозов А.С., Громова Л.В. Оценка уровня всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс различных линий в естественных условиях // Ж. эвол. биохимии и физиологии. 2018. Т. 54, №4. С.271-277.
2. Полозов А.С., Савочкина Е.В., Громова Л.В. Всасывание моносахаридов в тонкой кишке крыс при экспериментальном диабете типа 2 // Здоровье и образование в 21 веке. 2018. том 20, № 12. С. 138-143.
3. Громова, Л.В., Полозов, А.С., Корнюшин, О.В., Грефнер, Н.М., Дмитриева, Ю.В., Алексеева, А.С., Груздков, А.А. Всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при экспериментальном диабете типа 2 // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2019. Т. 55, N 2.С.145-147.

### Список литературы:

1. А.М. Уголева Мембранный гидролиз и транспорт. Новые данные и гипотезы. 1986. 240 С.
2. Грефнер Н.М., Громова Л.В., Груздков А.А., Комиссарчик Я.Ю. Сравнительный анализ распределения транспортеров SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крыс и клетках Caco 2 при всасывании гексоз // Цитология. – 2010. – V. 52, № 7. – С. 580-587.
3. Груздков А.А., Громова Л.В., Дмитриева Ю.В., Алексеева А.С. Скорость свободного потребления крысами раствора глюкозы как критерий оценки ее всасывания в тонкой кишке (Экспериментальное исследование и математическое моделирование). // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 6. – С. 708-720.
4. Груздков А.А., Громова Л.В. Всасывание глюкозы в тонкой кишке после различных по уровню локальных субстратных нагрузок. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 5. – С. 630-641.
5. Baud G., Raverdy V., Bonner C., Daoudi M., Caiazzo R., Pattou F. Sodium glucose transport modulation in type 2 diabetes and gastric bypass surgery. // Surg. Obes. Relat. Dis. – 2016. – Vol. 12, № 6. – P. 1206-2.
6. Chao L.C., Wroblewski K., Zhang Z. et al. Insulin Resistance and Altered Systemic Glucose Metabolism in Mice Lacking Nur77. Diabetes. – 2009. – Vol. 58, N 12. – P.2788–2796. doi: 10.2337/db09-0763.
7. Chen K.T., Malo M.C., Moss A.K. et al. Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2010. –Vol. 299, N 2. – P. G467–G475. doi: 10.1152/ajpgi.00364.2009.
8. Cong Y., Li X., Bai Y. et al., Porcine aminopeptidase N mediated polarized infection by porcine epidemic diarrhea virus in target cells. Virology. – 2015. – Vol. 478. – P. 1–8. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.020.
9. Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 295, 2. – P. E227-37.
10. Hansen G.H., Niels-Christiansen L.L., Immerdal L. et al. Intestinal alkaline phosphatase: selective endocytosis from the enterocyte brush border during fat absorption. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2007. – Vol. 293, N 6. – P. G1325-32.

11. Kaliannan K., Hamarneh S.R., Economopoulos K.P. et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110, N 17. – P. 7003–7008. doi: 10.1073/pnas.1220180110.
12. Kellett G.L., Brot-Laroche E., Mace O.J., Leturque A. Sugar Absorption in the Intestine: The Role of GLUT2 // *Annu Rev Nutr.* 2008; 28:35-54. doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518.
13. Kramer W., Girbig F., Corsiero D. et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem.* –2005. – Vol. 280, N 2. – P. 1306-20.
14. Lalles J.P., Orozco-Solis R., Bolanos-Jimenez F. Perinatal Undernutrition Alters Intestinal Alkaline Phosphatase and Its Main Transcription Factors KLF4 and Cdx1 in Adult Offspring Fed a High-Fat Diet. *J Nutr Biochem.* – 2012. – Vol. 23, N 11. – P. 1490–7 . doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.10.001.
15. Lassenius M.I., Fogarty C.L., Blaut M. et al. Intestinal alkaline phosphatase at the crossroad of intestinal health and disease – a putative role in type 1 diabetes. *J Intern Med.* 2017 Jun;281(6):586-600. doi: 10.1111/joim.12607.
16. Lehmann A., Hornby P.J. Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2016. – Vol. 310, № 11. – P. G887-98.
17. Malo M.S. A High Level of Intestinal Alkaline Phosphatase Is Protective Against Type 2 Diabetes Mellitus Irrespective of Obesity // *EBioMedicine.* 2015 Dec; 2(12): 2016–2023. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.027.
18. Röder P.V., Geillinger K.E., Zietek T.S., Thorens B., Koepsell H., Daniel H. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 1-10.
19. Santiago C., Mudgal G., Reguera J. Allosteric inhibition of aminopeptidase N functions related to tumor growth and virus infection. *Scientific reports.* – 2017. –Vol. 7. – P. 46045. doi: 10.1038/srep46045.
20. Song P., Onishi A., Koepsel H., Vallon V. Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus. // *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* – 2016.– Vol. 20, № 9. – P. 1109-1125.
21. Tobin V., Le Gall M., Fioramonti X. et al. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes.* – 2008. – Vol. 57, № 3. – P. 555-62.