

БИОХИМИЯ

УДК 619:616-981.48-07:636.4

Г. А. Геворкян, А. М. Акопян, О. А. Мовсесян, А. А. Агабабова

Микробиота кишечника крыс под воздействием амфетамина

(Представленно академиком Ю.Т. Алексаняном 12/VIІ 2016)

Ключевые слова: *микробиота, кишечно-мозговая ось, морфология, нервная система, толстая кишка, воспалительный процесс.*

Изучение взаимоотношений между кишечником и мозгом, так называемой кишечно-мозговой оси (КМО), по-прежнему актуально. КМО – бинаправленная коммуникативная система, посредством которой мозг модулирует функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и наоборот. В основе КМО лежат нейронные, эндокринные и иммунологические механизмы, связанные друг с другом на организменном, органном, клеточном и молекулярном уровне [1].

Взаимоотношения между мозгом и микрофлорой кишечника (микробиота) являются одним из примеров кооперации нервной и иммунной систем, значение которых для организма в норме и при патологии трудно переоценить.

Еще в начале XX в. И. И. Мечников сравнивал микробиоту кишечника с функцией печени, предлагая рассматривать микробиоту кишечника как отдельный орган [2]. Сто лет спустя, в 2006 г., О’Хара и Шанахан также отнесли микробиоту к дискретному органу [3].

В настоящее время для обозначения всего генетического материала, содержащегося в микробиоте, принят термин «микробиом» [4, 5]. Численность генов микробиома на три порядка выше собственных генов организма человека, что послужило основанием для рассмотрения совокупности всех микроорганизмов в качестве «надорганизма» [6], суперорганизма [7]. Микробиоту кишечника можно отнести к важному элементу эндокринной системы, выполняющей ферментативную трансформацию сложных стероидных соединений и производных азота, относимых к классу прогормонов. Установлена связь между активностью микробиоты и функциональными особенностями нервной системы, которая может реализо-

ваться через взаимодействие низкомолекулярных метаболитов бактерий, входящих в состав нормального микробиоценоза с чувствительными нервными окончаниями в области синапса их с эпителиальными клетками слизистой. Сигнал в результате такого взаимодействия передается в центральную нервную систему для формирования соответствующих реакций всего организма [6, 8].

Желудочно-кишечный тракт иннервируется сложной и обширной периферической нервной системой. Кишечная нервная система организована как комплексная структура, которая контролирует перистальтику, кровоснабжение, потребление пищи, секрецию, иммунологические и воспалительные процессы в кишечнике.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния с комплексных позиций d-амфетамина (Sigma, St. Louis, Mo.) как реакционного психоактивного стимулятора ЦНС на организм крыс, в частности на отдельные участки мозга, КМО, кишечную микробиоту.

Опыты проводились в динамике, но мы остановимся на отдельных конкретных, повторяющихся результатах.

Материалы и методика. Опыты осуществляли с соблюдением правил содержания и обращения с животными, изложенных в Директивах парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 (2010/63/ЕС), одобренных комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА. Эксперименты проводили на половозрелых 3-месячных белых крысах-самцах линии Вистар массой 100-140 г, которые содержались в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа воды и пищи. Животные были разделены на группы (по 18 животных в группе): I – контрольная группа (здоровые крысы), II и III – опытные группы, в которых животные ежедневно (кроме выходных) в течение 9 дней получали одноразовую внутрибрюшинную инъекцию (0.2 мл; 18 инъекций) d-амфетамина (Sigma, St. Louis, Mo.) в возрастающих нетоксических дозах: 4 мг/кг (II группа) и 6 мг/кг. Животных исследовали сразу и через 3 недели после прекращения введения АМРН. Поведение животных, включая локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность, оценивали в тестах «открытое поле» (ОП) и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Крысу помещали в ОП и в течение первых 3 мин наблюдения визуально регистрировали двигательную активность (горизонтальную и вертикальную), число актов очищения (груминг) и дефекаций [9]. Сразу после теста ОП животных помещали на открытую площадку ПКЛ и в течение первых 3 мин регистрировали число заходов в открытые и закрытые рукава, а также число оценок «риска» (число свешиваний с открытых рукавов лабиринта), стоек, груминга и дефекаций [10].

Результаты и обсуждение. Были проделаны морфологические исследования, материалом для которых служили резецированные ткани мозга размером около 0.6x0.6x0.4 см и ткани толстой кишки, взятые у экспериментальных крыс. Морфологическое исследование материала проводилось по общепринятой схеме с последующей заливкой в парафин и пригото-

нием серийных срезов. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Обзорная характеристика срезов давалась при увеличении микроскопа с окуляром E-PL-10 и объективом A-Plan 10/025 и A-Plan20/0,25.

При изучении мозговой ткани у крыс отмечались отек, пролиферация нейроцитов, появление атипичных клеток (рис. 3), в некоторых случаях незначительные кровоизлияния (рис.1). При гистологическом исследовании препаратов мозга наблюдались дистрофические изменения ткани (рис. 2). Что касается кишечника, была выявлена очаговая пролиферация желез слизистой толстой кишки. При такой морфогистохимической картине в условиях амфетаминового воздействия естественно возникает вопрос, что же происходит на другом конце оси КМО, в микробиоте кишечника, как реагируют условно патогенные и провоспалительные микробы, есть ли изменения в индигенной составляющей микробиоты, возможны ли варианты транслокации микробов.

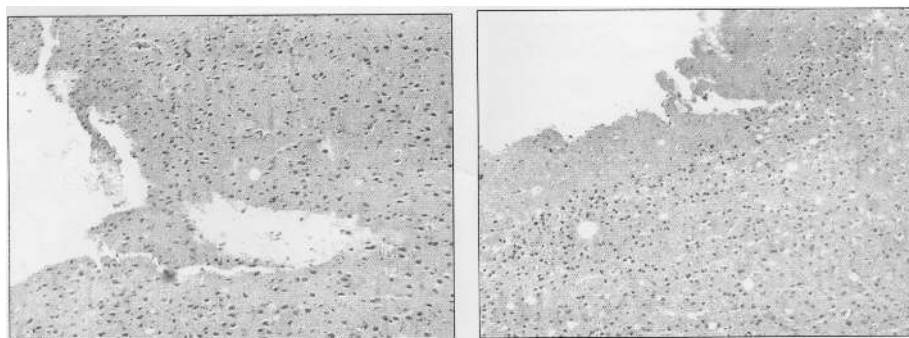


Рис. 1. Слабо выраженный отек, незначительное кровоизлияние. Окраска гематоксилин-эозином. X100.

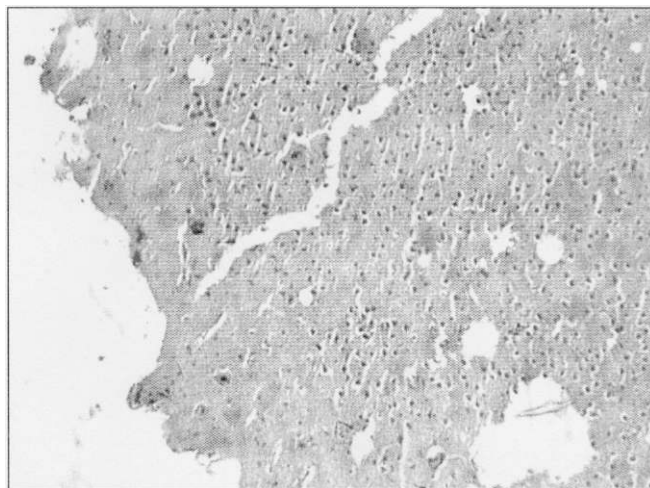


Рис. 2. Дистрофически измененная ткань мозга, отек. Окраска гематоксилин-эозином. X200.

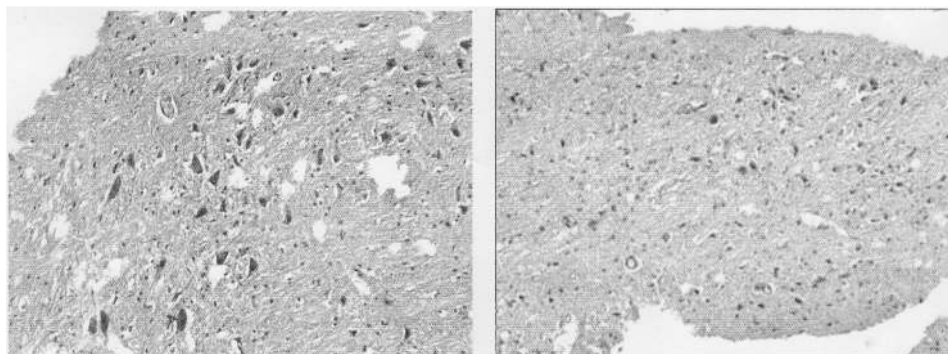


Рис. 3. Пролиферация нейроцитов, появление атипичных клеток. Окраска гематоксилин-эозином. X100.

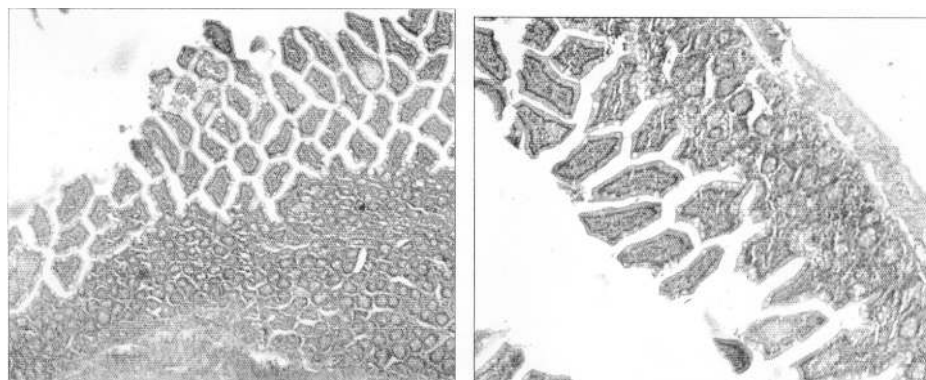


Рис. 4. Очаговая пролиферация желез слизистой толстой кишки. Окраска гематоксилин-эозином. X100.

Последующая цель данной работы – выявление некоторых оппортунистических микробов, в частности *E. coli*., провоспалительных *St. aureus*, соответственно грибов рода *Candida*.

Бактериологические исследования проводили согласно методическим рекомендациям по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями [4]. Выделяли следующие микроорганизмы: кишечную палочку (*E. coli*), золотистый стафилококк (*St. aureus*) и дрожжевые грибки рода *Candida* (*Candida albicans*). Количество выделенных микроорганизмов выражали в ед. КОЕ/г массы биологического материала. Брались смывы с мозга и содержимое толстой кишки.

На пике введения доз амфетамина наблюдались изменения и в поведении животных: истощенный вид (при нормальном питании) и сверхактивность. При вскрытии брюшина была тонкая, цианичная. В смывах головного мозга крыс были обнаружены единичные колонии *E. coli* и грибов рода *Candida albicans*. В крови на 10-й день после инкубации также обнаружены отдельные колонии кишечной палочки. Что касается каловых

масс, из них высеивался золотистый стафилококк, до $(4.4 \pm 0.3) \times 10^5$, кроме того наблюдались гемолизированные *E. coli* $(2.1 \pm 0.5) \times 10^2$. Резко увеличилось количество кишечных штаммов *E. coli* от нормы $(3.04 \pm 0.2) \times 10^3$ до $(4.5 \pm 0.6) \times 10^6$. Грибки рода *C. albicans* также отмечались в значительном количестве, норма $(1,8 \pm 0,3) \times 10^3$, высеивалось $(5,6 \pm 0,8) \times 10^3$.

В настоящее время известно, что депрессия сопровождается активацией системы воспаления и что провоспалительные цитокины и ЛПС могут индуцировать депрессивные симптомы [8].

Нарушения проницаемости слизистой ЖКТ приводило к повышенной транслокации бактерий и ЛПС, определяя важнейшую роль в патофизиологии депрессии [1, 11]. В наших исследованиях налицо изменения патофизиологического состояния животных, наличие воспалительного процесса, о чем свидетельствуют значительное количество *St. aureus*, резкое возрастание количества *E. coli*, соответственно, увеличение выброса количества ЛПС (эндотоксина) в кровь, кроме того, отмечается явление транслокации *E. coli*, о чем свидетельствует наличие её в крови и головном мозге. Состояние макроорганизма накладывает определенный отпечаток на характер формирующихся бактериально-хозяйинных взаимодействий, и, на наш взгляд, симбиотическая поливалентность *E. coli* в первую очередь обусловлена выраженным полиморфизмом данных бактерий по комплексу биологических характеристик.

Роль микрофлоры кишечника в развитии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), атеросклерозе и ожирении, стала очевидной благодаря исследованиям с использованием ОМИК-технологий [5, 12]. Изменение состава кишечной флоры способно спровоцировать симптомы раздраженного кишечника, при котором наблюдается не только увеличение количества некоторых индигенных микробов, в частности *Veilonella* и *Lactobacillus*, но также превышение уровня уксусной и пропионовой кислот, наличие которых коррелировало с тяжестью болезни, нарушением качества жизни и появлением негативных эмоций, в том числе депрессией [8]. Кишечная флора оказывает влияние на сенсорные, моторные и иммунные функции кишечника а также взаимодействует с высшими нервными центрами.

Коммуникации кишечника и мозга не ограничиваются потреблением пищи и насыщением, синтезом орексигенных и анорексигенных гормонов. Эти взаимоотношения, во многом зависящие от микрофлоры кишечника, формируют целостность барьерной функции кишечника и мозга, что реализуется с участием микроглии астроцитов [1, 2]. Барьерная дисфункция ЖКТ не только способствует развитию патологии кишечника, но также может приводить к мозговым нарушениям.

Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА

Գ. Ա. Գեորգյան, Ա. Մ. Ակոբյան, Օ. Ա. Մովսեսյան, Ա. Ա. Ագաբովա

Միկրոբիոտա լիարձակումի կրկնի տակ ազդեցութեամբ

Կիւղիար լիարձակումի ազդեցութեամբ լիարձակումի, մոտոր, իմունային ֆունկցիաների վրա, ինչպէս նաև փոխազդում բարձրագոյն նյարդային կենտրոնների հետ: Այդ փոխազդեցութեամբ շատ անգամ կախված են ազդեցութեամբ միկրոֆլորայից, նրանք ձևավորում են ազդեցութեամբ և գլխուղեղի պատնէշային ֆունկցիայի ամբողջականութեամբ: Աղետամոքսային տրակտի պատնէշային դիսֆունկցիան ոչ միայն նպաստում է ազդեցութեամբ ախտաբանութեամբ, այլև կարող է բերել ուղեղային խանգարումների:

**Գ. Ա. Գեորգյան, Ա. Մ. Ակոբյան, Օ. Ա. Մովսեսյան,
Ա. Ա. Ագաբովա**

Մոնիթորինգի ազդեցութեամբ միկրոբիոտային ամֆետամինի ազդեցութեամբ

Ազդեցութեամբ ֆլորան գործում է ազդեցութեամբ սենսոր, մոտոր, իմունային ֆունկցիաների վրա, ինչպէս նաև փոխազդում բարձրագոյն նյարդային կենտրոնների հետ: Այդ փոխազդեցութեամբ շատ անգամ կախված են ազդեցութեամբ միկրոֆլորայից, նրանք ձևավորում են ազդեցութեամբ և գլխուղեղի պատնէշային ֆունկցիայի ամբողջականութեամբ: Աղետամոքսային տրակտի պատնէշային դիսֆունկցիան ոչ միայն նպաստում է ազդեցութեամբ ախտաբանութեամբ, այլև կարող է բերել ուղեղային խանգարումների:

**G. A. Gevorgyan, A. M. Hakobyan, H. A. Movsesyan,
A. A. Agababova**

Intestinal Microbiota in Rats under the Influence of Amphetamine

Gut flora affects the sensory, motor and immune functions of the intestine, and interacts with the higher nerve centers as well. These relationships depend on the intestinal microflora in many respects; they formulate the integrity of the barrier function of the gut and the brain. Barrier dysfunction of the gastrointestinal tract not only promotes intestinal pathology, but also leads to brain disorders.

Լիարձակում

1. *Augustsson H., Meyerson B.* - *Physiol.* 2004. V. 814. P. 685-698.
2. *Бондаренко В. М., Рябиченко Е. В.* - *ЖМЭИ* 2013, N 2. С. 112-120.
3. *Бондаренко В.М., Лиходед В.Г.* - *Журн. микробиол.* 2012, N3, С. 82-89.
4. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. Высш. шк. 1991. 399 с.
5. *Wilis C.L.* - *Toxicol. Pathol.* 2011. V. 39(1). P. 172-185.
6. *Neufeld K.M., Kang N. et al.* – *Neurogastroenterol Motil.* 2011. V. 25. P. 255-264.
7. *Օ՝Hara A. M., Shanahan F.*, *EMBO*, 2006. 7(7). P. 688-6938.
8. *Парфенов А.И., Бондаренко В.М.* – *Архив патологии* 2012. N2. С. 21-25.
9. *Покровский М. А.* Методические рекомендации. М. 1984. 10.
10. *Plughoeft K.Y., Versalovic Y.* - *Ann. Rex. Pathoe Mech.Dis.* 2012. 7. P. 99-122.
11. *Turubaugh P.Y., Ley R.E.* - *Nature.* 2006. V. 444(7122). P. 1027-1031.
12. *Шендеров Б.А.* – *Вестник вост. мед.* 2012. N 3(49). С. 70-78.