

## ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭНДОГЕННОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА

**Л. П. Кнышова<sup>1, 2, 3</sup>, С. В. Поройский<sup>1, 2</sup>, А. Т. Яковлев<sup>4</sup>, Е. И. Морковин<sup>3, 4</sup>**

<sup>1</sup>Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра медицины катастроф,

<sup>2</sup>ГБУ ВМНЦ, лаборатория моделирования патологии,

<sup>3</sup>ГБУ ВМНЦ, лаборатория геномных и протеомных исследований,

<sup>4</sup>НИИ фармакологии, лаборатория психофармакологии,

<sup>5</sup>Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра клинической лабораторной диагностики ФУВ

Проблема алкоголизации детей и подростков, связанные с ней снижение трудового потенциала, социальная напряженность могут рассматриваться как важнейшие угрозы национальной безопасности. В представленном исследовании проведена оценка изменений микрофлоры кишечника при экспериментальной хронической эндогенной алкогольной интоксикацией у крыс, как составляющего понятия резистентности организма. Полученные данные являются частью клинико-экспериментального исследования изменений состояния резистентности организма, подвергнутого острому и хроническому воздействию алкоголя.

**Ключевые слова:** алкоголизм, эндогенная интоксикация, микробиоценоз кишечника, экспериментальное моделирование.

## EFFECT OF EXPERIMENTAL CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION ON ENDOGENOUS INTESTINAL MICROFLORA

**L. P. Knyshova<sup>1, 2, 3</sup>, S. V. Poroytsky<sup>1, 2</sup>, A. T. Yakovlev<sup>4</sup>, E. I. Morkovin<sup>3, 4</sup>**

<sup>1</sup>Volgograd state medical university, Department of Disaster Medicine,

<sup>2</sup>GBU VMNTS, pathology laboratory simulation,

<sup>3</sup>GBU VMNTS laboratory genomic and proteomic research,

<sup>4</sup>SRI pharmacology, psychopharmacology laboratory,

<sup>5</sup>Volgograd state medical university, Department of Clinical Laboratory Diagnostics HFC

The problem of alcohol abuse of children and adolescents, related reduction of labor potential, social tensions can be seen as the major threat to national security. In the present study evaluated the changes of intestinal microflora in experimental chronic endogenous alcohol intoxication in rats as a constituent of the concept of resistance of the organism. The findings are part of a clinical and experimental study of the resistance state changes of an organism subjected to acute and chronic effects of alcohol.

**Key words:** alcoholism, endogenous intoxication, microbiocenosis intestine, experimental modeling.

В настоящее время уровень потребления алкоголя считается одной из трех наиболее приоритетных проблем в области общественного здравоохранения в мировом масштабе [11, 14]. По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отравления спиртосодержащей продукцией занимают третье место в структуре острых отравлений и составляют 21,2 % [12]. Наиболее уязвимым для воздействия токсического фактора алкоголя является растущий организм [13]. Несовершенство и незрелость естественных защитных механизмов определяют тяжелые последствия воздействия этилового спирта на детский организм [1, 2, 6].

Согласно современным представлениям, эндогенная интоксикация (ЭИ) — это каскадный, стадийный, способный к прогрессированию генерализованный процесс, который обусловлен накоплением в кровяном русле токсических субстанций в концентрациях, превышающих функциональные возможности естественных систем детоксикации с последующим нарушением других органов и систем организма [3]. ЭИ является одним из типо-

вых патологических процессов, осложняющим течение большого количества заболеваний и приводящим к развитию полиорганной недостаточности [5].

Особое место в патогенезе ЭИ занимает дисфункция микробиоценозов в тех или иных биотопах человеческого организма, возникающая при различных патологических состояниях. При этом до настоящего времени недостаточно изучен вклад нарушений микробиоценоза кишечника в структуру формирования нарушений резистентности организма. В последние годы определились области, в которых от состояния микробной флоры, выраженности ее нарушений напрямую зависят успех и сама возможность проведения лечения основного заболевания. Нормальная микрофлора способна к осуществлению обезвреживающей функции в отношении многих токсических субстратов и метаболитов (нитраты, ксенобиотики, гистамин, мутагенные стероиды), предохраняя тем самым энтероциты и отдаленные органы от воздействия повреждающих факторов и канцерогенов [7]. Доказано, что негативные изменения микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, снижая детоксикационную

функцию индигенной флоры, увеличивают функциональную нагрузку на печень. В перечне патологических процессов, развивающихся в печени и во внепеченочной билиарной системе, обусловленных транслокацией кишечной микрофлоры и ее токсинов во внутреннюю среду макроорганизма, представлены: неалкогольный стеатоз, стеатогепатит, неспецифический реактивный гепатит, внутрипеченочный интралобулярный холестаз, печеночно-клеточная дисфункция, воспалительные процессы и дискинетические нарушения внепеченочного билиарного тракта [15]. Таким образом, от выраженности нарушений микробной флоры кишечника напрямую зависят успех и сама возможность проведения лечения хронической алкогольной интоксикации.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить динамику изменений микрофлоры кишечника при экспериментальной хронической эндогенной алкогольной интоксикации у крыс разного возраста.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 40 аутбредных лабораторных крысах-самцах в возрасте 3 и 6 месяцев, что соответствует возрасту 10 и 18 лет у человека [8]. Содержание животных и все манипуляции с ними соответствовали международным нормам и правилам по работе с позвоночными лабораторными животными. Световой цикл в помещениях был инвертирован для исключения негативного влияния суточных биоритмов на пищевое и питьевое поведение животных [10].

Животные были разделены на 4 группы: 2 контрольные, 2 экспериментальные (10 особей) в соответствии с возрастом: I контрольная группа — животные в возрасте 3 месяцев соответствует 10 годам у человека, II контрольная группа — животные 6 месяцев, что соответствует 18 годам у человека, I экспериментальная группа — животные 3 месяцев, II экспериментальная группа — животные 6 месяцев. Контрольные группы содержались в стандартных условиях с постоянным доступом к чистой воде. В экспериментальных группах в качестве единственного источника жидкости использовался 15%-й раствор этанола.

На 20-е сутки эксперимента с целью подтверждения алкоголизации организма животного проводился тест предпочтения этанола [4]. Для этого животные помещались в индивидуальные клетки на 2,5 часа. После 2-часовой водно-пищевой депривации в клетку помещались две поилки: с чистой водой и с 15%-м раствором этанола. В течение следующих 30 мин подсчитывались объемы выпитых жидкостей и общее время контакта с каждой из поилок. После измерения объема выпитой жидкости высчитывался коэффициент предпочтения алкоголя ( $D = 100 \% \cdot V_{\text{алк}} / V_{\text{общ}}$ ).

Оценка состояния микрофлоры кишечника крыс производилась дважды: до начала эксперимента (по истечению срока карантина) и на 40-е сутки эксперимента. Фекалии собирали непосредственно из прямой кишки

в стерильный контейнер методом массирования кишечника для исключения попадания сторонней микрофлоры и мочевых осадков в образец. Микрофлора кишечника оценивалась методом бактериологического посева по стандартным методикам [7, 8]. В качестве объектов микробиологического исследования были выбраны *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli hemolizing*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Proteus spp.* и *Staphylococcus spp.*

Статистическая обработка производилась при помощи программы GraphPad Prism 5.0; проверка распределения осуществлялась по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка, межгрупповые различия оценивались по U-критерию Манна-Уитни и при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении теста предпочтения были обнаружены изменения в питьевом поведении крыс, подвергнутых хронической добровольной алкоголизации. Так, в I и II экспериментальных группах было выявлено достоверное увеличение абсолютных объемов потребления воды и 15%-го раствора этанола (рис. 1).

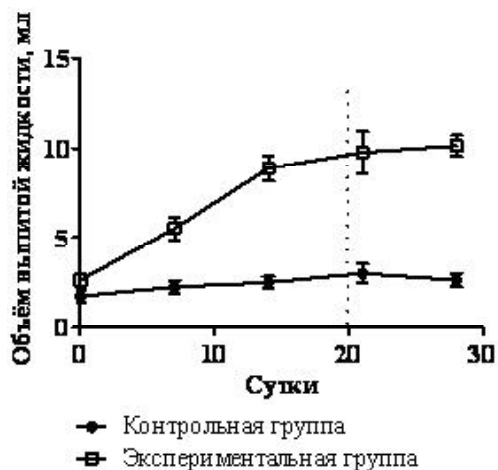


Рис. 1. Динамика питьевого поведения крыс на фоне добровольной хронической 20-дневной алкоголизации

Данные изменения связаны с развитием полидипсии как симптома алкогольной интоксикации [11]. При этом в экспериментальной группе к 20-м суткам эксперимента была отмечена выраженная тенденция ( $p = 0,0811$ ) к повышению коэффициента предпочтения алкоголя, что может отражать успешное воспроизведение не только хронической алкогольной интоксикации, но и формирование алкогольной зависимости у крыс I и II экспериментальных групп [4] (рис. 2).

Констатация данного факта стала критерием начала проведения лабораторных исследований состояния микрофлоры в период органической и психической алкогольной зависимости.

Проведенное микробиологическое исследование выявило изменения в составе микробной флоры I и II контрольных групп крыс, I и II экспериментальных групп.

В I и II контрольных группах наблюдалась адаптационная стабилизация микрофлоры кишечника, соответствующая периоду пребывания экспериментальных животных на карантине (табл.).

При анализе результатов микробиологического исследования в I и II опытных группах было выявлено,

что пул *Bifidobacterium spp.* был в пределах нормы и составил  $2,2 \cdot 10^8$  —  $1 \cdot 10^8$  КОЕ (рис. 3).

Содержание *Lactobacterium spp.* также было выявлено в пределах нормы  $2,2 \cdot 10^7$  —  $1 \cdot 10^7$  КОЕ (рис. 4).

В I и II экспериментальных группах было выявлено достоверное увеличение количества патогенной флоры. Так, при анализе непροбиотических штаммов на 40-е сутки добровольной алкоголизации крыс по сравнению с нормой было показано статистически досто-

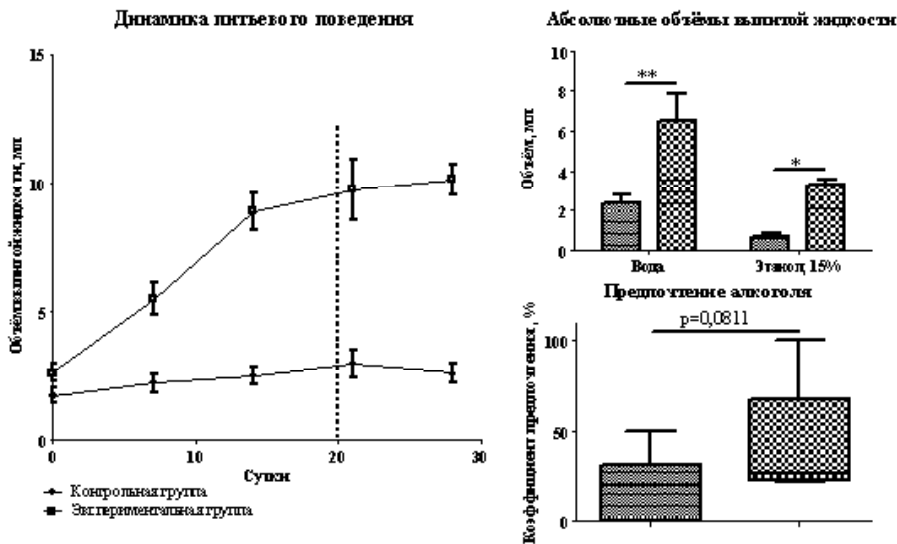


Рис. 2. Питьевое поведение и предпочтение алкоголя у крыс на фоне добровольной хронической 20-дневной алкоголизации, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

### Сравнительная динамика микрофлоры кишечника во время адаптационного периода, Log<sub>10</sub> (КОЕ/мл), $M \pm m$

Микрофлора кишечника	I контрольная группа		II контрольная группа	
	при поступлении	по окончании карантина	при поступлении	по окончании карантина
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$8,63 \pm 0,33$	$8,42 \pm 0,21$	$8,33 \pm 0,22^*$	$8,18 \pm 0,23$
<i>Lactobacterium spp.</i>	$7,08 \pm 0,53$	$7,75 \pm 0,11$	$7,33 \pm 0,17$	$7,00 \pm 0,39$
<i>E. coli.</i>	$6,75 \pm 0,13$	$7,19 \pm 0,43$	$6,92 \pm 0,08$	$7,38 \pm 0,36$
<i>E. coli hemolizing.</i>	$3,33 \pm 2,46$	$3,17 \pm 0,69$	$3,33 \pm 0,71$	$3,83 \pm 0,11$
<i>Enterococcus spp.</i>	$5,58 \pm 1,16$	$5,25 \pm 0,54$	$6,50 \pm 0,22$	$6,33 \pm 0,42$
<i>Proteus spp.</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	$1,00 \pm 0,43$	$0,50 \pm 0,34$	$1,08 \pm 1,62$	$0,83 \pm 0,44$
<i>Candida spp.</i>	0	0	0	0

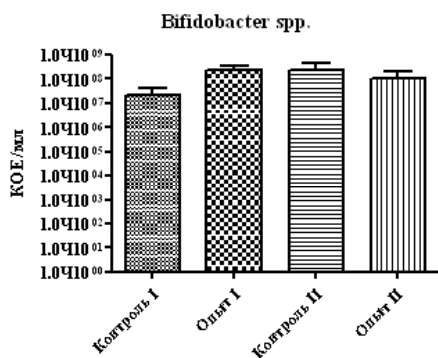


Рис. 3. Изменение числа КОЕ *Bifidobacterium spp.* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

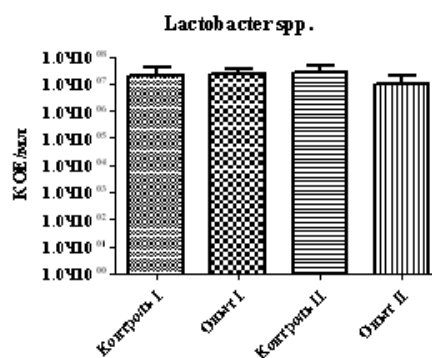


Рис. 4. Изменение числа КОЕ *Lactobacterium spp.* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

верное снижения *Escherichia coli*, которое составило  $1,2 \cdot 10^7$ — $2,1 \cdot 10^5$  КОЕ (рис. 5).

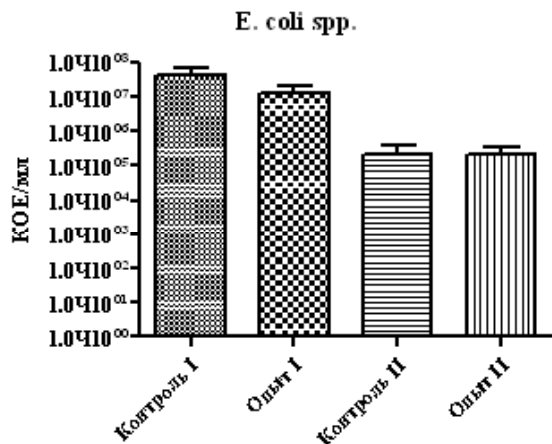


Рис. 5. Изменение числа КОЕ *Escherichia coli*. В фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

Также было выявлено повышение *Enterococcus spp.*  $1,2 \cdot 10^7$ — $1,1 \cdot 10^7$  КОЕ (рис. 6) и ряда штаммов *Staphylococcus spp.*  $1 \cdot 10^2$ — $1 \cdot 10^1$  КОЕ в различных концентрациях (рис. 7).

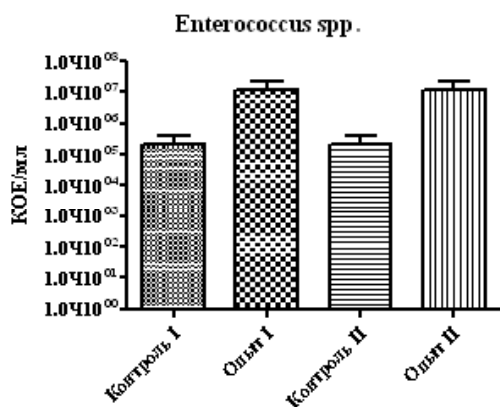


Рис. 6. Изменение числа КОЕ *Enterococcus spp.* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

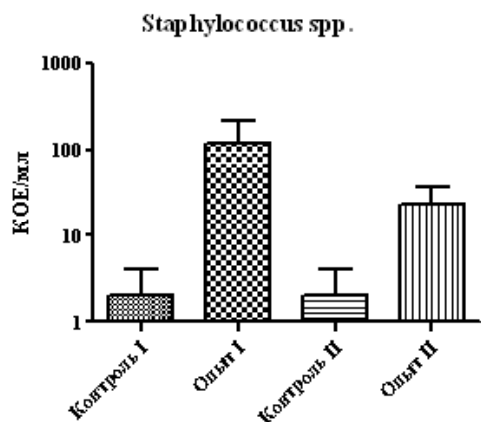


Рис. 7. Изменение числа КОЕ *Staphylococcus spp.* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

По результатам оценки изменения уровня *Escherichia coli hemolizing* прослеживалась более выраженная тенденция увеличения титра ( $1 \cdot 10^7$ — $1 \cdot 10^6$  КОЕ) (рис. 8).

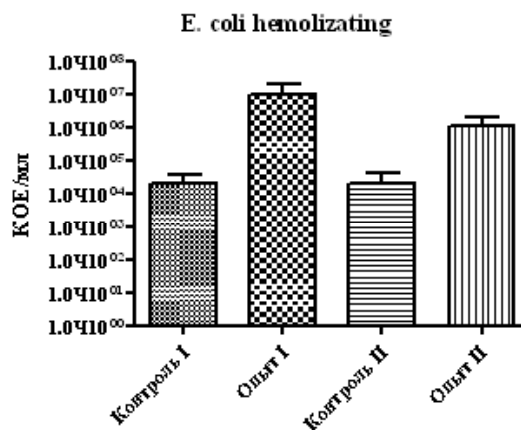


Рис. 8. Изменение числа КОЕ *Escherichia coli hemolizing* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

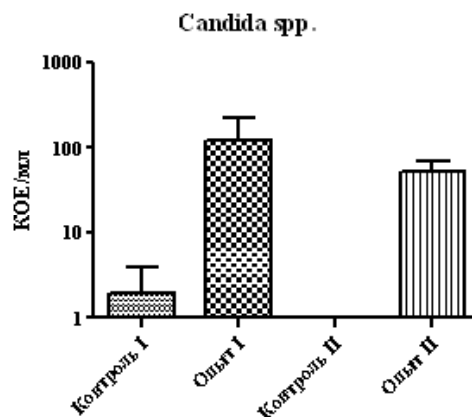


Рис. 9. Изменение числа КОЕ *Candida spp.* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

При проведении добровольной алкоголизации в группах крыс были выделены микроорганизмы семейства *Proteus spp.* в различных концентрациях ( $1,1 \cdot 10^2$ — $1,3 \cdot 10^1$ ) (рис. 10).

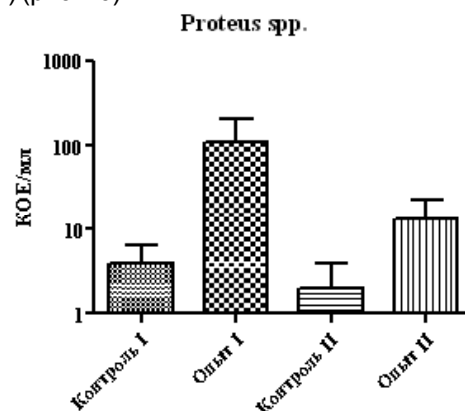


Рис. 10. Изменение числа КОЕ *Proteus spp.* в фекалиях крыс на фоне добровольной хронической 40-дневной алкоголизации

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведение теста предпочтения при экспериментальном моделировании хронической алкогольной интоксикации является важным методологическим дополнением, определяющим критерии достижения стадии органической и психической алкогольной зависимости. При этом алкоголизация достигается к 20-м суткам экспериментальной модели.

2. При экспериментальном исследовании микрофлоры кишечника важным этапом, определяющим достоверность результатов является учет периода адаптационной стабилизации микрофлоры за время периода пребывания животного в карантине.

3. Хроническая эндогенная алкогольная интоксикация у крыс I и II экспериментальных групп сопровождается изменением равновесия биоценоза кишечника в сторону патогенной флоры. При этом наиболее выраженный сдвиг биоценоза в сторону патогенной флоры наблюдается у животных старшей возрастной группы — II экспериментальная группа.

4. Состояние микрофлоры кишечника является важным функциональным звеном резистентности организма, учет изменений которой является значимой составляющей персонализированного подхода к определению тактики лечения детей с хронической алкогольной интоксикацией.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Булычева О. С. и др. Подростковый алкоголизм как угроза жизни / А. В. Бухало, О. А. Гомазкова, О. С. Булычева // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2012. — № 1. — С. 53.
2. Каурина А. В. и др. Алкоголизм и наркомания как медикосоциальная проблема населения Российской Федерации / А. В. Каурина, А. В. Харитоновна, С. В. Поройский // Международный студенческий научный вестник. — 2015. — № 2. — С. 176—177.
3. Кнышова Л. П. и др. Экзо- и эндогенные этиологические факторы нарушения микробиоценоза / Л. П. Кнышова, А. Т. Яковлев, С. С. Ларионов // Современные инновации. — 2016. — № 5 (7). — С. 53—57.
4. Кнышова Л. П. и др. Критерии достоверности воспроизведения экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации / Л. П. Кнышова, С. В. Поройский, А. Т. Яковлев, Е. И. Морковин, А. С. Тарасов // Волгоградский научно-медицинский журнал. — 2016. — № 4 (52).
5. Писарев В. Б. и др. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога / В. Б. Писарев, Н. В. Богомоллова, В. В. Ночадов — Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2008. — С. 310.
6. Поройский С. В. и др. Наркомания и молодое поколение / А. С. Гребенникова, С. В. Поройский, Е. Б. Сысу-

ев // Успехи современного естествознания. — 2013. — № 9. — С. 94.

7. Прокопенко К. М. Антагонистическая активность пробиотических штаммов по отношению к условно-патогенным микроорганизмам и лакто- и бифидобактериям / К. М. Прокопенко, Л. П. Кнышова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. — 2015. — № 6—2. — С. 148—152.

8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. — М.: Профиль-2С, 2010. — С. 358.

9. Сысуева Ю. В. и др. Изменение микробиоценоза кишечника как элемент эндогенной интоксикации при раке молочной железы / Л. П. Кнышова, Ю. В. Сысуева, Ю. Н. Нартя // Евразийский союз ученых. — 2015. — № 10 (19). — С. 91—93.

10. Тарасов А. С. и др. Влияние агонистов мелатониновых рецепторов на профиль экскреции 6-сульфатоксимелатонина у крыс, подвергнутых комбинированному стрессу / А. С. Тарасов, В. В. Степанова, Е. И. Морковин // Вестник ВолГМУ. — 2015. — № 4 (56). — С. 110—112.

11. Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Волгоградской области. Актуальные проблемы здоровья населения Волгоградской области, обусловленные злоупотреблением алкоголем по результатам социально-гигиенического мониторинга. — Волгоград, 2015. — С. 1—5.

12. Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Волгоградской области. Анализ результатов токсикологического мониторинга в Волгоградской области за первое полугодие 2016 г. (по данным статистической формы № 12—15). — Волгоград, 2016. — С. 3—7.

13. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Анализ острых отравлений, в том числе алкоголем, населения Волгоградской области в 2011 году по показателям социально-гигиенического мониторинга. — Волгоград, 2012. — С. 2—3.

14. Харитоновна А. В. и др. Структура заболеваемости населения социально значимыми болезнями / А. В. Харитоновна, А. В. Каурина, А. В. Михно, С. В. Поройский // Международный студенческий научный вестник. — 2015. — № 2. — С. 183—184.

15. Шейман Б. С. и др. Дифференциально-диагностические признаки определения схемы детоксикационной терапии у больных с различной патологией / Б. С. Шейман, О. И. Осадчая, К. Г. Козинец // Лаб. диагностика. — 1999. — № 4. — С. 11—13.

## Контактная информация

**Кнышова Лилия Петровна** — преподаватель кафедры медицины катастроф, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: knyshovalliya@inbox.ru