

На правах рукописи

Кнышова Лилия Петровна

**Состояние микробиоты кишечника на фоне хронической алкогольной
интоксикации (Экспериментальное исследование)**

03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственном бюджетном учреждении «Волгоградский медицинский научный центр»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Яковлев Анатолий Трофимович**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент **Поройский Сергей Викторович**

Официальные оппоненты:

Алешукина Анна Валентиновна

доктор медицинских наук, руководитель лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

Рубальский Олег Васильевич

профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ставропольский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ставрополь.

Защита состоится «___» _____ 20__ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.06 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной научной библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; <http://www.volgmed.ru/ru/dsovet/thesis/834/>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д. соц. н., к. м. н., профессор

Ковалева Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Увеличение темпов распространения заболевания алкоголизмом, является серьезной проблемой современного общества, которая сопровождается последствиями, выходящими за рамки сугубо медицинских и является одним из факторов демографического и социального кризиса в России [Яковлева А. В., Софронов Р. П., 2009; Малахова Ж. Л., 2013; Ерпылов А. А., 2015; Поплавская О. В. и др., 2015; Солдатова Е. И., Макарычева Г. Г., 2016]. Согласно статистике Роспотребнадзора, в 2017 году число зависимых от алкоголя граждан достигло 12,5 миллионов. Среднее употребление спиртного за год составило 23,9 л у мужчин, 7,8 л у женщин. По официальным прогнозам ВОЗ на 2020 год уровень потребления возрастет до 15 л в год [Анохина И. П. и др., 2017].

В настоящее время алкоголизм официально признан врачами болезнью (F10.2– F11), изменяющей физическое и психическое состояния. Злоупотребление алкоголем негативно сказывается на функционировании практически всех органов и систем организма в результате токсического действия этанола [Сирота Н. А. и др., 2008; Анохина И. П. и др., 2011; Кошкина Е. А. и др., 2016]. Патологические изменения, развивающиеся во внутренних органах при хроническом алкоголизме (F10.2.4.1), связывают с прямым (метаболические, тканевые и адаптационные расстройства) и косвенным воздействием алкоголя (в связи с травмами, снижением иммунной системы и повышенной чувствительностью к инфекциям) [Кирпич И. А., Шелыгин К. В., 2000; Успенский Ю. П., Балукова Е. В., 2008; Анохина И. П., 2011; Ульянова Л. И. и др., 2013; Isolauri E, Kalliomaki M, Laitinen K, Salminen S., 2008].

Поражение органов и систем, вследствие хронической алкогольной интоксикации (ХАИ), вызывает ряд патологических процессов, приводящих к глубоким структурным и функциональным нарушениям в органах и системах, которые сопровождаются перестройкой обменных процессов, приводя, тем самым, к декомпенсации регуляторных и защитных систем организма [Огурцов П. П., Жиров И. В., 2002; Пауков В. С. и др., 1991; Кошкина Е. А., Павловская Н. И., Ягудина Р. И. и др., 2009]. В условиях эндогенной интоксикации организма, вызванной чрезмерным употреблением алкоголя, особое место принадлежит микробиоте кишечника, реагирующей качественными и количественными изменениями на состояние организма в различных условиях жизнедеятельности, здоровья и болезни [Vode S., Vode J. S., 2003].

В число биологических эффектов этанола входят развитие синдрома избыточного бактериального роста в тонком кишечнике, нарушение барьерной функции кишечника, а также таксономические изменения микробиоты кишечника, которые могут стать источником эндотоксинов, активирующих клетки Купфера, способствуя синтезу провоспалительных цитокинов и воспалению печени, а также стимуляции фиброгенеза [Лейхтер С. Н., Лебедева О. В., 2005; Бакулин И. Г., Шаликиани Н. В., 2016; Топчий Т. Б. и др., 2017; Varaona E. et al., 1986; Vode Ch., Schäfer C., 1998; Yan A. W. et al., 2011].

Таким образом, состояние микробиоты различных биотопов кишечника является важным звеном патогенезе целого ряда заболеваний [Алешукина А. В., 2012]. Несмотря на значительные успехи в изучении механизмов развития

дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта многие вопросы остаются малоизученными.

Проблема коррекции нарушений микробиоты кишечника приобретает особую значимость с точки зрения персонализированного подхода к определению тактики лечения хронической алкогольной интоксикации.

Степень разработанности темы

По результатам биомедицинских исследований микробиоты человека, в частности – микробиоты кишечника, получены доказательства, подтверждающие связь нарушений кишечного биоценоза с широким спектром заболеваний [Булатова Е. М. и др., 2009; Крамарь Л. В., Крамарь О. Г., 2015; Хавкин А. И., Комарова О. Н., 2015; Бакулин И. Г., Шаликиани Н. В., 2016; Минушкин О. Н. и др., 2017]. Оригинальные эксперименты, выполненные на животных моделях, показали влияние изменения таксономического состава микробиоты на развитие патогенетических процессов большинства заболеваний, в том числе алкоголизма [Vode S., Vode J. C., 2003; L. Bull-Otterson et al., 2013].

Накопленные данные указывают на способность алкоголя изменять состав микробиоты кишечника [Malaguarnera M., Greco F., Barone G., Gargante M. P. et al., 2007]. Установлена решающая роль метаболита этанола – ацетальдегида в нарушении барьерной функции кишечника [Chen Y., Yang F., Lu H., Wang B. et al., 2011]. По данным Basuroy et al. (2005) ацетальдегид вызывает снижение экспрессии мРНК ZO-1 и клаудина 1 (белки плотных контактов) в биоптатах толстого кишечника человека *in vitro* [Basuroy S., Sheth P., Mansbach C. M., Rao R. K., 2005]. Однако результаты представленных работ не могут быть применены для решения проблем диагностики и коррекции лечения хронической алкогольной интоксикации у человека.

В связи с этим представляется актуальным изучение состояния микробной флоры кишечника, что, в свою очередь, позволит оценить вклад кишечной микробиоты в патогенез хронической алкогольной интоксикации, а также определить новые подходы в диагностике и лечении данного патологического процесса.

Цель исследования – определить динамику изменения микробиоценоза кишечника и показателей иммунной системы на фоне хронической алкогольной интоксикации.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальную модель хронической алкогольной интоксикации.
2. Изучить изменения состава и динамику качественных и количественных изменений микробиоты кишечника при экспериментальной хронической алкоголизации.
3. Определить динамику изменения лабораторных показателей иммунной системы при экспериментальной хронической алкоголизации.

4. Выявить клинико-экспериментальные параллели изменения кишечной микробиоты и лабораторных показателей иммунной системы у экспериментальных животных и лиц с установленным диагнозом хронического алкоголизма (зависимость от алкоголя (F10.2.4.1)).

Научная новизна исследования

Впервые определены объективные критерии эффективности экспериментального воспроизведения модели добровольной хронической алкоголизации и разработан способ «Способ моделирования экспериментальной хронической алкогольной интоксикации» (приоритет на изобретение № 2018107103 от 26.02.2018).

Впервые проведено изучение динамики изменения кишечной микробиоты при экспериментальной хронической алкоголизации.

Впервые выявлены периоды изменений микробиологических показателей при экспериментальном воспроизведении хронической алкоголизации.

Впервые определены клинико-экспериментальные параллели изменения кишечной микробиоты и клинико-лабораторных показателей состояния резистентности организма у экспериментальных животных и лиц с установленным диагнозом хронического алкоголизма (зависимость от алкоголя (F10.2.4.1)).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о дисбиотических нарушениях кишечника на фоне хронической алкогольной интоксикации расширяют представление о патогенезе процесса эндотоксикоза при хронической алкоголизации организма.

Выявлена взаимосвязь изменений биоценоза кишечника, являющегося важным функциональным звеном резистентности организма, с изменениями показателей иммунной системы при хронической алкогольной интоксикации.

Полученные клинико-экспериментальные данные об изменении состояния микробиоты кишечника на фоне хронической алкогольной интоксикации, свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших клинических исследований микробиологических маркеров, характеризующих патогенетические изменения организма при хронической алкогольной интоксикации, учет изменения которых является значимой составляющей персонализированного подхода к определению тактики лечения хронической алкогольной интоксикации.

Методология и методы исследования

Учитывая поставленные задачи, выбор методических подходов осуществлялся из современных высокоинформативных методов, имеющихся в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр». Исследование осуществлялось на самцах крыс линии Вистар (170-250 г). Основные методы исследования, направленные на изучение особенностей состава микробиоты кишечника, иммунологических и биохимических показателей организма крыс на фоне хронической алкогольной интоксикации проводились с учетом руководства по лабораторным животным и альтернативным моделям в

биомедицинских исследованиях под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева, с соблюдением Международных рекомендаций «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Исследование было одобрено Региональным независимым этическим комитетом (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)), протокол № 215-2015 от 8.05.2015 г.

Эвтаназия при выведении животных из эксперимента выполнялась путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг. Статистическая обработка результатов исследования проводилась после проверки характера распределения по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок, распределение которых отличалось от нормального, использовали U-критерий Манна-Уитни. При большем количестве групп данных, подчиняющихся закону нормального распределения, применяли однофакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса. Для множественных сравнений данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали критерий Краскела-Уолиса с постобработкой тестом Данна. Обсчет проводили в программе GraphPad Prism 5.0.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан способ экспериментального моделирования состояния хронической алкогольной интоксикации, достоверность воспроизведения которого подтверждается объективными критериями: тестами питьевого поведения, предпочтения этанола и тяжести неврологической.

2. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к изменению качественного и количественного состава биоценоза кишечника, характеризующегося смещением равновесия в сторону патогенной флоры, сокращением сахаролитической микробиоты – *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2–4 порядка, увеличение протеолитической микрофлоры – *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* на 3–4 порядка, с увеличением активности аэробов на высоте алкогольобусловленной интоксикации. Обнаружено появление типичных представителей дисбиотических процессов – *Candida spp.* и *Proteus spp.*

3. Хроническая алкогольная интоксикация сопровождается активацией провоспалительных систем организма, характеризующейся нарушением цитокинового профиля (увеличение концентраций IL-1 β и IL-6 в плазме крови более чем в 2 раза, незначительное повышению активности TNF- α) и биохимических показателей, характеризующиеся периодичностью.

4. Выявлены обратные корреляционные взаимосвязи между содержанием сахаролитической микробиоты и плазменными концентрациями провоспалительных цитокинов, указывающие на связь дисбиотических нарушений с системным воспалительным ответом при эндогенной интоксикации.

5. Выявлены клинко-экспериментальные параллели изменения изучаемых показателей у лиц с установленным диагнозом хронического алкоголизма (зависимость от алкоголя (F10.2.4.1)), заключающиеся в увеличении продукции провоспалительных цитокинов по мере сокращения сахаролитической микробиоты.

Степень достоверности и апробация результатов

При выполнении работы, использовалось современное, высокотехнологичное оборудование и современные методы исследования. Анализ экспериментальных данных был выполнен с использованием современного программного обеспечения и корректных методов и критериев статистического анализа, что говорит о высокой степени достоверности результатов исследования. Основные результаты выполненного диссертационного исследования были представлены на 74-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (20–23 апреля 2016 г., г. Волгоград), на XI Международной научно-практической конференции «Наука сегодня: теория, практика, инновации» (1 мая 2016 г., г. Москва), на IX международной научно-практической конференции. н.-и. ц. «Академический» «Наука в современном информационном обществе» (1–2 августа 2016 г., North Charleston, USA), на XIII Съезде молодежных научных обществ медицинских и фармацевтических вузов России и стран СНГ Под редакцией В. И. Петрова (21–24 сентября 2016 г., г. Волгоград), на XXI региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (8–11 ноября 2016 г., диплом III степени), на III международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины в современных условиях» (11 января 2017 г., г. Санкт-Петербург), на XVIII Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в науке и образовании» (27 января 2017 г., г. Москва), на XIX Международной научно-практической конференции «Научные исследования и разработки» (22 февраля 2017 г., г. Москва), на 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (19–22 апреля 2017 г., г. Волгоград), на XXII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (22 ноября 2017 г., г. Волгоград), на Региональной научно-практической конференции «Эпидемиология и микробиологические аспекты инфекционных болезней, современные методы лабораторной диагностики» (3–4 мая 2018 г., г. Волгоград), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Исследование живых систем в постгеномную эру» (15-18 мая 2018 г., г. Волгоград).

Публикации по теме работы

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 4 в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Получен приоритет на изобретение (№2018107103 от 26.02.2018).

Объём диссертации и структура

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 21 рисунок, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных

результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 210 источника, в том числе, 152 отечественных и 58 зарубежных.

Внедрение результатов исследования

Основные результаты работы включены в учебный процесс на кафедрах: микробиологии, вирусологии и иммунологии с курсом клинической микробиологии; патофизиологии, клинической патофизиологии; фундаментальной медицины и биологии; медицины катастроф, при подготовке клинических ординаторов, а также в цикле усовершенствования врачей КЛД на кафедре клинической лабораторной диагностики с курсом клинической лабораторной диагностики ФУВ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты проведенного исследования внедрены в научную работу лабораторий: моделирования патологии; геномных и протеомных исследований ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», внедрены в работу лаборатории психофармакологии НИИ Фармакологии ВолгГМУ, а также лабораторию иммунологии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно провел анализ современных литературных источников, касающихся темы диссертации, с учетом чего разработаны дизайн исследования, протоколы экспериментов и описаны полученные результаты. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии в планировании и выполнении всех этапов работы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. Автор принимал участие в заборе биологического материала и подготовке его к микробиологическим, биохимическим и иммунологическим исследованиям. При написании диссертационной работы автором выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи, активное участие в написании обзорных и оригинальных статей по теме диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен **литературный обзор**, в котором рассматриваются современные медико-социальные аспекты алкоголизма в России, влияние хронической алкогольной интоксикации на состояние иммунной системы и метаболические процессы организма, отражены изменения микробиоты кишечника под действием хронической алкоголизации, показана значимость экспериментального изучения алкогольобусловленной патологии. **Глава 2** посвящена описанию **материала и методов исследования** и включает экспериментальное моделирование хронической алкогольной интоксикации, которое было разработано и проведено согласно руководству по лабораторным

животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева, в соответствии с правилами лабораторной диагностики (GLP), с соблюдением Международных рекомендаций «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Дизайн исследования был согласован и одобрен Региональным этическим комитетом, протокол № 215-2015 от 8.05.2015 г. Исследование выполнено на 80 самцах крыс линии Вистар (ветеринарное свидетельство 234 №6595160 от 26.09.2016 г.), в возрасте 3-х и 6-ти месяцев (ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА, г. Волгоград, Россия). Животные были рандомизированы и разделены на 4 группы в соответствии с возрастом: I группа (контрольная, n = 10) – животные в возрасте 3-х месяцев, II группа (контрольная, n = 10) – животные в возрасте 6-ти месяцев, III группа (экспериментальная, n = 30) – животные в возрасте 3-х месяцев, IV группа (экспериментальная, n = 30) – животные в возрасте 6-ти месяцев. Контрольные группы составляли животные, не подвергавшиеся никакому воздействию, содержащиеся в стандартных условиях с постоянным доступом к чистой воде и корму (ГОСТ Р 51849 - 2001, ООО «Лабораторкорм», г. Москва, Россия). В экспериментальных группах животных в качестве единственного источника жидкости использовался 15% раствор этанола (ОАО «Медхимпром», Балашиха, Московская обл., Россия) в течение 40 суток. На 20-е сутки эксперимента с целью подтверждения алкоголизации организма животного проводился тест предпочтения этанола. 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% раствором этилового спирта. В течение следующих 30 минут подсчитывались объёмы выпитой жидкости и общее время контакта с каждой из поилок. После измерения объёма выпитой жидкости высчитывался коэффициент предпочтения алкоголя ($D = 100\% * V_{алк} / V_{общ}$). С целью оценки тяжести неврологической симптоматики на 20-е сутки эксперимента нами была использована шкала тяжести неврологической симптоматики (Modified Neurological Severity Scores, mNSS) [Куркин Д. В. и др., 2017; Chen J. et al., 2001].

Для микробиологического исследования микробиоты кишечника фекалии собирали непосредственно из прямой кишки крыс в стерильный контейнер методом массирования кишечника крыс для исключения попадания сторонней микрофлоры и мочевых осадков в образец. Материал доставляли в лабораторию не позднее 2 часов с момента забора. В промежутке между взятием пробы, отправки в лабораторию и до посева, материал хранили в холодильнике в специальных контейнерах при температуре +4, +6°C. Микробиота кишечника оценивалась культуральными, биохимическим и микроскопическим методами по стандартным унифицированным методикам. Оценка состояния микробиоты кишечника крыс производилась дважды: до начала эксперимента (по истечению срока карантина) и на 40-е сутки эксперимента.

В качестве объектов микробиологического исследования были выбраны *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*, *Escherichia coli* (включая гемолизирующие штаммы), *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Proteus spp.* и *Staphylococcus spp.*

Исследование количественного и качественного микробного пейзажа толстого

кишечника проводили в соответствии с требованиями приложения к приказу Минздрава России от «9» июня 2003 г. № 231 (ОСТ 91500.11.0004-2003) на базе бактериологической лаборатории ООО НПО «Волгоградский центр профилактики болезней «ЮгМед».

Определение видового и количественного состава кишечной микробиоты проводили согласно методике, предложенной Московским НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского и оценивали по отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003).

В качестве биологического материала для иммунологических исследований использовали образцы периферической крови крыс, подвергнутых экспериментальной хронической алкоголизации и интактных животных контрольной группы. Определение уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора «Cusabio Biotech Co., Ltd» (Китай), согласно инструкции производителя. Для получения сыворотки у животных забирали по 1 мл крови в пробирки типа Эппендорф и оставляли ее на 2 часа при $t = 25^{\circ}\text{C}$, а затем центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин на центрифуге CM-50 Elmi (Латвия), после чего отбирали сыворотку в микроцентрифужные пробирки. Учёт результатов, построение калибровочных графиков и определение концентрации проводили при помощи микропланшетного спектрофотометра iMark Bio-Rad (США).

Определение активности ферментов в плазме крови проводили стандартными биохимическими методами («Ольвекс диагностикум») с использованием реагентов «Диакон-ДС» (Россия) на фотометре СФ-26 (Россия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов следующих программ: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Проверка характера распределения осуществлялась по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для показателей с распределением, отличающимся от нормального, определялись медиана (Me), 75-й и 25-й перцентили (75-й; 25-й). Для показателей, распределение которых соответствовало нормальному, определялись среднее арифметическое (M) и ошибка среднего (SEM). Межгрупповые различия оценивались в зависимости от характера полученных данных: U-критерий Манна-Уитни применялся для сравнения двух групп данных, распределенных непараметрически; для большего количества групп применялся однофакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса (нормальное распределение), ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с пост-хок тестом Данна (непараметрическое распределение); двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса применялся для оценки совокупности изменений по показателям, изменяющимся во времени.

В главе 3 представлены **результаты собственных исследований**, дана характеристика критериев достоверности воспроизведения хронической алкогольной интоксикации, динамика изменений состояния микробиоты кишечника и показателей иммунной системы при моделировании хронической алкогольной интоксикации.

Глава 4 посвящена описанию **результатов клинических наблюдений** изменения состояния микробиоты кишечника у лиц с диагнозом хронической алкогольной интоксикации, находившихся на лечении в ГБУЗ «Волгоградская областная наркологическая больница».

В главе «**Обсуждение полученных результатов**» приводится обобщение данных, полученных в ходе эксперимента и клинических наблюдений, их интерпретация с учетом литературных фактов.

Разработанная нами модель хронической алкогольной интоксикации характеризовалась появлением изменений в состоянии микробиоты кишечника, изменениями динамики некоторых показателей иммунной системы, свидетельствующими о формирующемся в ходе дисбиотических изменений провоспалительном ответе, являющимся значимым патогенетическим звеном эндогенной интоксикации, возникающей на фоне хронической алкоголизации.

Согласно литературным данным, существуют различные механизмы, развития синдрома избыточного бактериального роста (СИБР), ассоциированного с хроническим употреблением алкоголя. Один из них связан со способностью этанола изменять активность натрий-зависимых транспортеров глюкозы (SGLT), экспрессированных в желудочно-кишечном тракте, что приводит к нарушению всасывания глюкозы, скопление которой в просвете кишечника приводит к избыточному бактериальному росту в тонком кишечнике, что связано с увеличением доступности этого энергетически выгодного субстрата [Hauge T. et al., 1997; Yan A. W. et al., 2011]. Это состояние проявляется существенными количественными и качественными изменениями состава кишечной микробиоты [Бакулин И. Г., Шаликиани Н. В., 2016; Rolfe R. D., 1984; Bode Ch. et al., 1998; O'Toole, P. W. & Flemer, B., 2017].

Обнаруженные нами изменения микробиоты кишечника в ходе анализа результатов микробиологического исследования состава микробной флоры у животных экспериментальной группы выявили сокращение представителей сахаролитической микробиоты – *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2–4 порядка (рисунок 1).

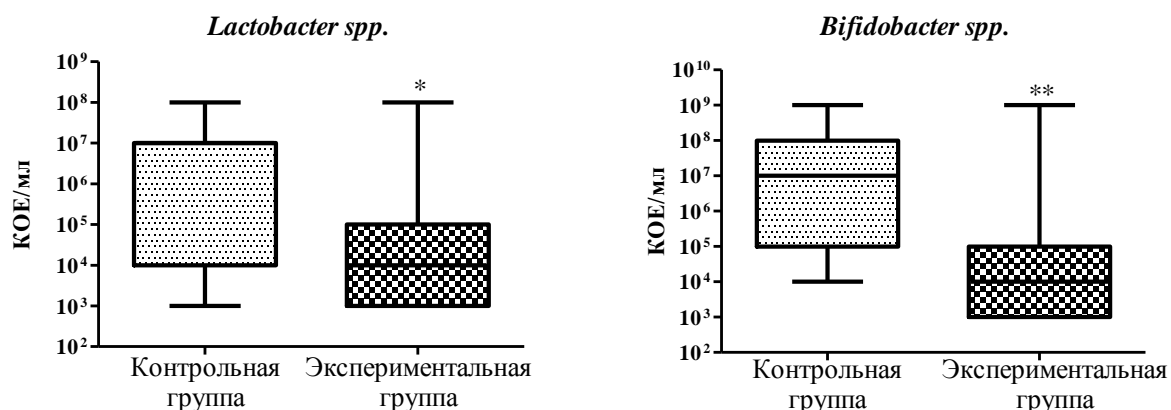


Рисунок 1 – Динамика сахаролитической микрофлоры (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*) в фекалиях крыс при моделировании хронической 40-дневной алкоголизации. *Примечание:* выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Оценка состава протеолитической микробиоты также выявила ряд изменений. Было установлено, что под влиянием алкоголя равновесие сместилось в сторону грамотрицательных протеобактерий, являющихся источником эндотоксинов. Так, в опытной группе наблюдалось повышение *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* на 3-4 порядка по сравнению с показателями контрольной группы. Это сопровождалось значительным увеличением количества гемолизирующих штаммов *Escherichia coli* (рисунок 2) до $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^7$ КОЕ и ростом высеваемости в опытной группе *Candida spp.* и *Proteus spp.*, которые составили $1,2 \cdot 10^2$ КОЕ и $1,3 \cdot 10^1$ – $1,1 \cdot 10^2$ соответственно.

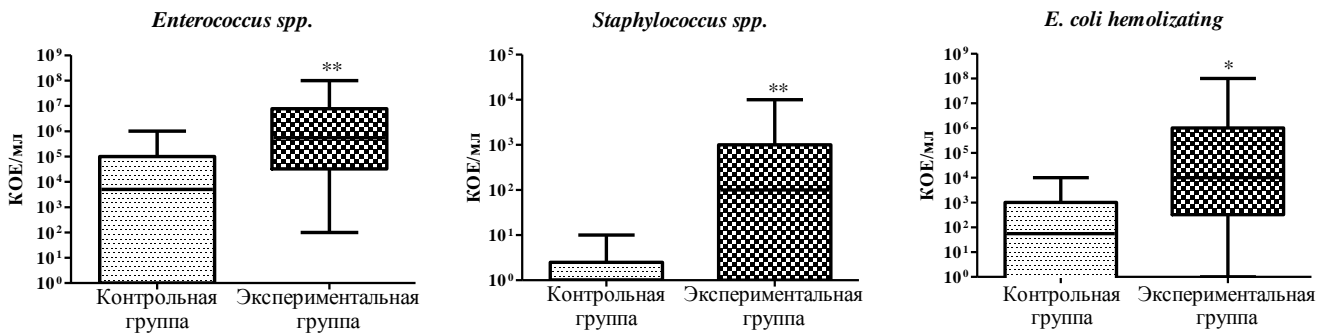


Рисунок 2 – Динамика нормальных представителей протеолитической микробиоты (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*) и гемолизирующих штаммов *Escherichia coli* в фекалиях крыс при моделировании хронической 40-дневной алкоголизации. *Примечание:* выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни; ** – $p < 0,01$

Образование ацетальдегида, метаболита этанола, происходит не только под действием алкогольдегидрогеназы, экспрессированной в эпителиоцитах кишечника, но и благодаря некоторым представителям микробиоты. В условиях дисбиоза микробиота становится лидирующим продуцентом ацетальдегида, дальнейший метаболизм которого до уксусной кислоты значительно замедляется [Baraona E. et al., 1986; Loguercio C. et al., 2005; Chen Y. et al., 2011]. Увеличение концентрации ацетальдегида в просвете кишечника оказывает выраженное дозозависимое влияние на барьерную функцию кишечной стенки, что связано с изменением физико-химических свойств белков плотного и адгезионного контакта. Нарушение проницаемости кишечной стенки приводит к транслокации бактериальных эндотоксинов, в частности грамотрицательные бактерии становятся постоянным источником ЛПС, которые активируют печеночные макрофаги и приводят к продукции провоспалительных цитокинов – TNF- α , IL-1 β , IL-6 [Алешукина А. В. и др., 2012; Malaguarnera M. et al., 2007]. В нашей работе было установлено нарушение цитокинового профиля в динамике экспериментальной хронической алкогольной интоксикации. У животных экспериментальной группы содержание IL-1 β в плазме крови достоверно ($p < 0,001$) увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с контрольными животными группы. Кроме того, эти изменения сопровождались статистически значимым повышением плазменных концентраций IL-6 ($p < 0,01$) и TNF- α ($p < 0,05$), что говорит о развитии воспалительных процессов, сопровождающих эндогенную интоксикацию. Таким образом, проведенное исследование показало, что увеличение количества условно патогенных

энтеробактерий, *Staphylococcus spp.*, дрожжевых грибов рода *Candida spp.* и *Proteus spp.* при дисбиозе кишечника на фоне хронической алкогольной интоксикации приводит к активации противовоспалительной защиты организма, т.к. экспрессия генов цитокинов начинается в ответ на проникновение в организм патогенов или повреждение тканей. Клетки иммунной системы способны реагировать как на комменсальные бактерии, так и на патогенную микробную флору. Обнаруженные изменения могут быть следствием воздействия бактериальных токсинов на функции иммунной системы.

Известно, что выделение провоспалительных цитокинов способствует миграции и пролиферации макрофагов в стенке кишечника, снижению проницаемости кишечной стенки для водорастворимых веществ. Этот процесс обуславливает замедление всасывания питательных веществ, способствующее развитию гипогликемии, характеризующейся снижением концентрации глюкозы в крови ниже 3,5 ммоль/л. Для компенсации нехватки глюкозы запускается процесс гликогенолиза.

Следующий метаболит этанола – уксусная кислота, представляет собой важное с точки зрения биохимии соединение, которое относят к короткоцепочечным жирным кислотам. Поступая в кровоток и достигая клеток поджелудочной железы, оно оказывается способным запускать в β -клетках ряд процессов, приводящих к экзоцитозу инсулина, что дополнительно увеличивает гипогликемию. В таких условиях естественной реакцией организма становится гиперсекреция глюкагона, приводящая к активации липолиза в жировой ткани, а также активации гликогенолиза. Более того, в результате активации симпатической нервной системы, увеличивается продукция глюкостероидов, стимулирующих процесс глюконеогенеза, достигающая наибольших значений при увеличении стажа алкоголизации и истощении запасов гликогена в мышцах и печени.

Липолиз, происходящий в белой жировой ткани, сопровождается явлением, названным в работе Н. Bayes (2004) «липотоксичностью». Это явление сопровождается увеличением плазменных концентраций свободных жирных кислот и повышением эндокринной активности адипоцитов, продуцирующих ряд гормонов и провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, адипонектин и др.). Липотоксичность проявляется снижением тканевой и сосудистой чувствительности к инсулину, развитием системного воспаления, а также нарушением продукции инсулина.

Активация глюконеогенеза сопровождается изменением белкового обмена, в результате чего снижается не только эндокринная, но и экзокринная функция поджелудочной железы. Изменение количественного и качественного состава секрета поджелудочной железы приводит к нарушению переваривания пептидов и липидов. Накопление данных веществ в просвете кишечника способствует «новой волне» дисбиоза, что связано с увеличением доступности субстратов для протеолитических микроорганизмов. Продукты метаболизма пептидов, включающие фенол, скатол и индол, способны оказывать влияние на инкретиновую систему, что углубляет нарушения углеводного обмена.

Таким образом, прогрессирующие дисбиотические нарушения кишечного микробиома при хронической алкоголизации следует рассматривать как сложную, многокомпонентную систему, по типу хронического токсико-инфекционного очага,

неразрывно связанную с нарушениями углеводного, белкового и липидного обменов, изменениями в функционировании нервной и эндокринной систем, а также с ростом признаков системного воспаления.

Как известно, АлАТ является биохимическим признаком поражения печени, однако в условиях стресса и сопутствующего им повышения синтеза глюкокортикоидов, синтез АлАТ может резко увеличиваться, что связано с необходимостью активации глюконеогенеза в связи с устойчивой потребностью организма в энергетически ценных субстратах. В нашей работе было отмечено статистически значимое увеличение активности аминотрансфераз ($p < 0,001$), которое сопровождалось значимым ($p < 0,05$) увеличением активности ЛДГ. Обнаруженные изменения могут быть объяснены тем, что при воспалительных поражениях печени поддержание уровня глюкозы в крови за счёт гликогенолиза может нарушаться, что обуславливает увеличение распада эндогенных белков и последующее вовлечение гликогенных аминокислот при помощи трансаминаз в глюконеогенез, необходимый для поддержания гликемии.

Корреляционный анализ на высоте алкогольобусловленной интоксикации у крыс (Таблица 1) продемонстрировал наиболее сильные обратные корреляционные взаимосвязи между концентрациями IL-1 β и содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = -0,631$, $p < 0,05$) или *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,653$, $p < 0,05$), а также прямая взаимосвязь между концентрациями IL-1 β и содержанием гемолизирующих штаммов *E. coli* ($r = 0,433$, $p < 0,05$). Полученные данные позволяют предполагать наличие обратной взаимосвязи между увеличением выделения цитокинов и уменьшением количества сахаролитической флоры, сопровождающих эндогенную интоксикацию на фоне хронической алкоголизации организма.

Корреляции, носившие обратный характер, были также выявлены между концентрацией IL-6 и содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = -0,595$, $p < 0,05$) или *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,568$, $p < 0,05$), а также между концентрацией TNF- α и содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = -0,597$, $p < 0,05$) или *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,557$, $p < 0,05$).

Таким образом, дисбиотические нарушения кишечника коррелируют с изменением цитокинового профиля крови экспериментальных животных, обуславливая провоспалительную реакцию организма, что соответствует патогенетическому механизму эндогенной интоксикации.

При корреляционном анализе также был выявлен ряд взаимосвязей между содержанием различных представителей кишечной микробиоты. Так, содержание *Bifidobacterium spp.* коррелировало с содержанием *Enterococcus spp.* ($r = -0,457$, $p < 0,05$), *Staphilococcus spp.* ($r = -0,471$, $p < 0,05$) и гемолитических штаммов *E. coli* ($r = -0,500$, $p < 0,05$), причем взаимосвязь носила обратный характер. На этом фоне прямая взаимосвязь была обнаружена между содержанием гемолизирующих штаммов *E. coli* и содержанием *Staphilococcus spp.* ($r = 0,535$, $p < 0,05$), *Candida spp.* ($r = 0,450$, $p < 0,05$).

Корреляционный анализ параметров ферментативной активности и микробиологических показателей также выявил как обратные, так и прямые взаимосвязи между активностью АлАТ и содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = -$

0,528, $p < 0,05$), *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,508$, $p < 0,05$), *Staphilococcus spp.* ($r = 0,521$, $p < 0,05$) или гемолизирующих штаммов *E. coli* ($r = 0,501$, $p < 0,05$).

Подобная корреляционная взаимосвязь прослеживалась между активностью АсАТ и содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = -0,565$, $p < 0,05$) или *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,486$, $p < 0,05$), и содержанием гемолизирующих штаммов *E. coli* ($r = 0,486$, $p < 0,05$).

Таблица 1 – Корреляционный анализ на высоте алкогольобусловленной интоксикации у крыс

	АлАТ	АсАТ	ЛДГ	<i>Lactobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Bifidobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Spp</i>	<i>Staphilococcus</i> <i>Spp</i>	<i>E.coli</i> <i>hemolizing</i>	<i>Candida</i> <i>spp.</i>	<i>Proteus</i> <i>spp.</i>	IL-1 β	IL-6	TNF α
АлАТ		0,882*	0,575*	-0,528	-0,508*	0,313	0,521*	0,501*	0,327	0,226	0,580*	0,416*	0,407*
АсАТ	0,882*		0,690*	-0,565	-0,486*	0,330	0,411*	0,486*	0,364	0,054	0,710*	0,591*	0,594*
ЛДГ	0,575*	0,690*		-0,451	-0,227	0,176	0,389*	0,342	0,170	0,117	0,424	0,370	0,395*
<i>Lactobacter spp.</i>	-0,528*	-0,565*	-0,451*		0,730	-0,377	-0,239	-0,334	-0,010	0,003	-0,631*	-0,595*	-0,597*
<i>Bifidobacter spp.</i>	-0,508*	-0,486*	-0,227	0,730		-0,457*	-0,471*	-0,500*	-0,295	0,010	-0,653*	-0,568*	-0,557*
<i>Enterococcus spp.</i>	0,313	0,330	0,176	-0,377	-0,457*		0,397*	0,852*	0,446*	0,305	0,338	0,213	0,203
<i>Staphilococcus spp.</i>	0,521*	0,411	0,389	-0,239	-0,471*	0,397		0,535*	0,180	-0,054	0,349	0,210	0,232
<i>E.coli hemolizing</i>	0,501*	0,486*	0,342	-0,334	-0,500*	0,852	0,535*		0,450*	0,343	0,433*	0,324	0,313
<i>Candida spp.</i>	0,327	0,364	0,170	-0,010	-0,295	0,446*	0,180	0,450*		0,278	0,372	0,220	0,217
<i>Proteus spp.</i>	0,226	0,054	0,117	0,003	0,010	0,305	-0,054	0,343	0,278		-0,159	-0,285	-0,348
IL-1 β	0,580*	0,710*	0,424	-0,631*	-0,653*	0,338	0,349	0,433*	0,372	-0,159		0,960*	0,946*
IL-6	0,416	0,591*	0,370	-0,595*	-0,568*	0,213	0,210	0,324	0,220	-0,285	0,960*		0,994*
TNF α	0,407	0,594*	0,395*	-0,597*	-0,557*	0,203	0,232	0,313	0,217	-0,348	0,946*	0,994*	

Примечание: * – корреляционная зависимость, $p < 0,05$

Обнаруженные межсистемные связи в группе экспериментальных животных могут свидетельствовать об относительно зависимом функционировании ферментных систем сыворотки крови и микробного гомеостаза кишечника.

Аналогичные зависимости были выявлены и в ряде клинических наблюдений. Корреляционный анализ, проведенный у лиц с зависимостью от алкоголя (хронический алкоголизм (F10.2.4.1)), также выявил ряд взаимосвязей. В отношении содержания представителей сахаролитической микробиоты наибольшая обратная корреляционная взаимосвязь наблюдались между концентрацией IL-1 β и содержанием *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,820$, $p < 0,05$), а также концентрацией TNF α и содержанием *Bifidobacterium spp.* ($r = -0,974$, $p < 0,05$). В группе протеолитических бактерий прямая корреляционная взаимосвязь была обнаружена между концентрацией IL-1 β и содержанием *Staphilococcus spp.* ($r = 0,870$, $p < 0,05$).

Была выявлена также корреляция между концентрацией TNF α и содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = -0,900$), которая, однако, не была статистически значимой ($p > 0,05$).

Содержание *E. coli* коррелировало с содержанием *Lactobacterium spp.* ($r = 0,08$), *Staphilococcus spp.* ($r = -0,8$) и концентрацией IL-1 β ($r = -0,08$), однако взаимосвязь не была статистически значимой ($p > 0,05$), что может быть связано с небольшим размером исследуемой выборки.

Другие корреляционные взаимосвязи, представленные в Таблице 7, были менее сильными и не были статистически значимыми. По-видимому, значение гемолизирующих штаммов *E. coli* в развитии эндогенной интоксикации невелико, на что указывают слабые и недостоверные корреляционные связи с основными параметрами, характеризующими воспалительный ответ организма.

Таким образом, как у экспериментальных животных, так и у лиц с зависимостью от алкоголя можно выделить общие тенденции в изменении микробного пейзажа кишечника и цитокинового статуса, включающие в себя увеличение продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α , находящееся в обратной корреляционной взаимосвязи с численностью представителей сахаролитической микробиоты (*Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*), и в прямой корреляционной взаимосвязи с представителями протеолитической микрофлоры – *Staphilococcus spp.*. Несмотря на высокий коэффициент корреляции между концентрацией IL-1 β и содержанием *E. coli*, данная взаимосвязь не была статистически значимой.

Корреляционный анализ на высоте алкогольобусловленной интоксикации (Рисунок 3) продемонстрировал наиболее сильные корреляционные взаимосвязи между содержанием *Bifidobacterium spp.* и концентрациями IL-1 β или TNF- α , которые были статистически значимы как у крыс, так и у лиц с зависимостью от алкоголя (F10.2.4.1) ($p < 0,05$).

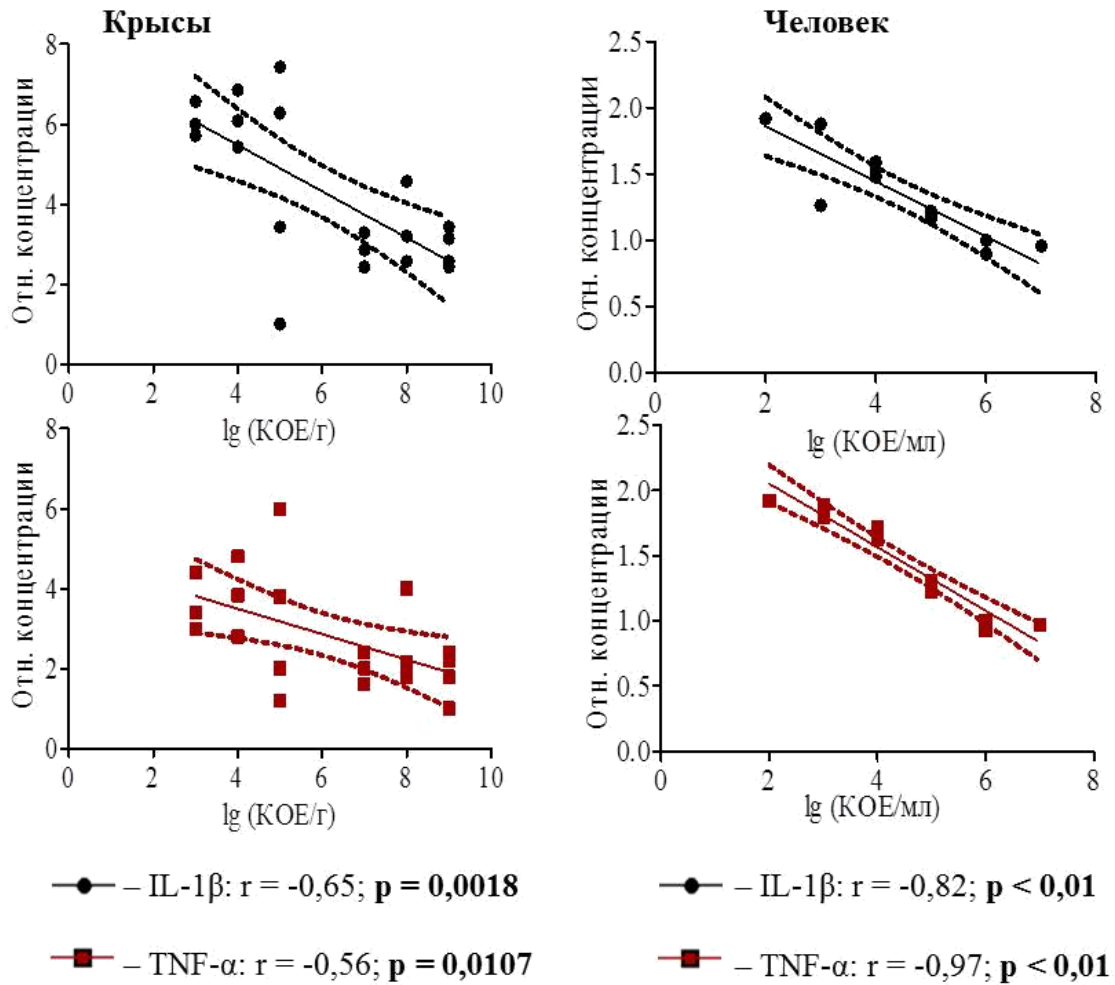


Рисунок 3 – Корреляции между *Bifidobacter spp.* и концентрациями цитокинов $IL-1\beta$ и $TNF-\alpha$ у крыс (слева) и человека (справа).

Полученные данные демонстрируют наличие обратной взаимосвязи между увеличением выделения цитокинов и уменьшением количества сахаролитической флоры, сопровождающих эндогенную интоксикацию на фоне хронической алкоголизации организма. Таким образом, формирующийся в ходе дисбиотических изменений провоспалительный ответ представляет собой значимое патогенетическое звено эндогенной интоксикации, возникающей на фоне хронической алкоголизации.

Таким образом, клиничко-экспериментальные данные и результаты корреляционного анализа состояния микробиоты кишечника и показателей иммунной системы свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших глубоких клинических исследований маркеров кишечной микробиоты, характеризующих патогенетические изменения организма при хронической алкогольной интоксикации, учет изменения которых является значимой составляющей персонализированного подхода к определению тактики лечения хронической алкогольной интоксикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами показано, что алкоголь приводит к развитию различных патологических процессов в системах органов и тканей. При систематическом употреблении этанол может быть одним из основных факторов, влияющих на качественный и количественный состав микробиоты кишечника, метаболизм которой тесно интегрирован в метаболизм человека, изменения которого могут стать причиной различных заболеваний.

Несмотря на многочисленные исследования патогенеза алкоголизма, на сегодняшний день, не существует адекватной модели для изучения алкогольобусловленной патологии, поиска потенциальных средств лечения алкоголизма и экстраполяции полученных данных на человека, что в свою очередь, определяет создание новых и усовершенствование имеющихся экспериментальных моделей на животных.

Разработанная модель хронической алкогольной интоксикации позволила установить объективные критерии оценки тяжести данного состояния. Моделирование хронической алкогольной интоксикации выполнено на самцах крыс линии Вистар с использованием метода искусственной полидипсии. На каждом этапе эксперимента была произведена оценка физического состояния животных с учетом изменений их неврологического статуса. анализ микробиоты кишечника оценивался культуральными, биохимическим и микроскопическим методами по стандартным унифицированным методикам. Оценка состояния микробиоты кишечника крыс производилась дважды: до начала эксперимента (по истечению срока карантина) и в конце эксперимента. Лабораторные показатели иммунной системы, включающие оценку активности трансаминаз печени и концентрации провоспалительных цитокинов, оценивали в конце эксперимента. Анализ полученных данных был выполнен с использованием современного программного обеспечения и корректных методов параметрической и непараметрической статистики.

В ходе исследования, выполненного *in vivo*, обнаружено, что хроническая алкогольная интоксикация привела к смещению равновесия биоценоза кишечника крыс в сторону патогенной флоры, сокращению сахаролитической микрофлоры – *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2–4 порядка (*Lactobacterium spp.* на 6,82 log₁₀ КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* на 7,34 log₁₀ КОЕ/г). Обнаружено, увеличение протеолитической микрофлоры – *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* на 3–4 порядка (*Enterococcus spp.* на 1,18 log₁₀ КОЕ/г, *Staphylococcus spp.* также на 1,17 log₁₀ КОЕ/г). Также изменения таксономического состава микробиоты кишечника при хронической алкоголизации заключается в активном росте типичных представителей дисбиотических процессов, таких как, *Candida spp.* и *Proteus spp.* (1,2 × 10² log КОЕ и 1,1 × 10²-1,3 × 10¹ log КОЕ соответственно), являющихся источником эндотоксинов.

Эндотоксины, вырабатываемые бактериями в результате изменения колонизационной резистентности кишечника, активизируют печеночные макрофаги и приводят к продукции провоспалительных цитокинов – IL-1β, IL-6

в плазме крови крыс более чем в 2 раза (IL-1 β от 431,3 пг/мл до 581,3 пг/мл; IL-6 от 8,9 до 15,5 пг/мл), а также к незначительному повышению активности TNF- α (от 6,5 до 11,3 пг/мл). Более того, хроническая алкогольная интоксикация сопровождается увеличением активности в плазме крови АлАТ, АсАТ, ЛДГ, характеризующихся периодичностью и отражающих поражение печени вследствие эндогенной интоксикации.

Выявлены обратные корреляционные взаимосвязи между содержанием сахаролитической микробиоты и плазменными концентрациями провоспалительных цитокинов, указывающие на связь дисбиотических нарушений с системным воспалительным ответом при эндогенной интоксикации. Результаты экспериментального моделирования были подтверждены рядом клинических наблюдений, в ходе которых выявлено аналогичное увеличение продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β (5 пг/мл против $11,1 \pm 1,06$ пг/мл), по мере сокращения сахаролитической микрофлоры (*Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2–4 порядка) как пациентов, так и у экспериментальных животных.

Проведенное исследование позволяет расширить представление о прогрессирующем изменении микробиоты кишечника при хронической алкоголизации, которое неразрывно связано с нарушениями углеводного, белкового и липидного обменов, изменениями в функционировании нервной и эндокринной систем, а также с ростом признаков системного воспаления.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ экспериментального моделирования состояния хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что результаты проведения тестов питьевого поведения, предпочтения этанола и тяжести неврологической симптоматики являются объективными критериями эффективности экспериментального воспроизведения модели хронической алкоголизации организма.
2. Установлено, что в условиях хронической алкогольной интоксикации у животных экспериментальных групп наблюдается сокращение сахаролитической микрофлоры – *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2–4 порядка (*Lactobacterium spp.* на $6,82 \log_{10}$ КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* на $7,34 \log_{10}$ КОЕ/г).
3. Обнаружено, что на высоте алкогольобусловленной интоксикации организма животного наблюдается увеличение протеолитической микрофлоры – *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* на 3–4 порядка (*Enterococcus spp.* на $1,18 \log_{10}$ КОЕ/г, *Staphylococcus spp.* также на $1,17 \log_{10}$ КОЕ/г).
4. Обнаружено появление типичных представителей дисбиотических процессов – *Candida spp.* и *Proteus spp.* ($1,2 \times 10^2 \log$ КОЕ и $1,3 \times 10^1$ – $1,1 \times 10^2 \log$ КОЕ соответственно).
5. Установлено, что хроническая алкогольная интоксикация приводит к нарушению цитокинового профиля активизируя печеночные макрофаги и повышая продукцию провоспалительных цитокинов – IL-1 β , IL-6 в плазме

крови крыс более чем в 2 раза (IL-1 β от 431,3 пг/мл до 581,3 пг/мл; IL-6 от 8,9 до 15,5 пг/мл), а также незначительное повышение активности TNF- α (от 6,5 до 11,3 пг/мл).

6. Хроническая алкогольная интоксикация сопровождается изменением биохимических показателей (повышение активности АлАТ, АсАТ, ЛДГ), характеризующиеся периодичностью.

7. Выявлены обратные корреляционные взаимосвязи между содержанием сахаролитической микробиоты и плазменными концентрациями провоспалительных цитокинов, указывающие на связь дисбиотических нарушений с системным воспалительным ответом при эндогенной интоксикации.

8. Выявлены клиничко-экспериментальные параллели изменения изучаемых показателей у лиц с установленным диагнозом хронического алкоголизма (зависимость от алкоголя (F10.2.4.1)), заключающиеся в увеличении продукции провоспалительных цитокинов по мере сокращения сахаролитической микробиоты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенный способ моделирования экспериментальной хронической алкогольной интоксикации позволяет воспроизвести этиопатогенез хронической алкоголизации организма, оценить достоверность ее воспроизведения и может быть использован при проведении научно-исследовательских работ по изучению алкогольобусловленной патологии, а также при разработке фармакологических препаратов направленного действия.

Полученные данные о динамике изменений микробиоты кишечника и лабораторных показателей иммунной системы в норме и при экспериментальной хронической алкоголизации можно использовать в учебном процессе для преподавания микробиологии, патофизиологии, клинической лабораторной диагностики в высших медицинских учебных заведениях.

Выявленные клиничко-экспериментальные параллели изменения кишечной микробиоты и лабораторных показателей иммунной системы могут быть использованы для дальнейшего глубокого изучения в клинике и разработки схем лечения и реабилитации лиц с алкогольной зависимостью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кнышова, Л. П.** Дисфункция микробиоценоза кишечника в структуре эндогенной интоксикации [Текст] / Л. П. Кнышова, А. Т. Яковлев // Национальная Ассоциация Ученых. 2016. № 3-1 (19). С. 42-43.
2. **Кнышова, Л. П.** Экзо - и эндогенные этиологические факторы нарушения микробиоценоза [Текст] / Л. П. Кнышова, А. Т. Яковлев, С. С. Ларионов // Современные инновации. 2016. № 5 (7). С. 53-57.
3. **Кнышова, Л. П.** Эпидемиология употребления алкоголя среди лиц молодого возраста в г. Волгограде [Текст] / Л. П. Кнышова, М. В. Потехин // В сборнике: Наука сегодня: теория, практика, инновации сборник XI Международной научно-практической конференции. 2016. С. 427-429.
4. **Кнышова, Л. П.** Роль эндогенной интоксикации в нарушении гомеостаза организма человека при алкогольной интоксикации [Текст] / Л. П. Кнышова, А. Т. Яковлев // В сборнике: Наука в современном информационном обществе Материалы IX международной научно-практической конференции. н.-и. ц. «Академический». 2016. С. 31-33.
5. **Кнышова, Л. П.** Изменение микробиоценоза биотопов организма в динамике лечения детей с алкогольной интоксикацией [Текст] / Л. П. Кнышова, С. С. Ларионов // В сборнике: Материалы XIII Съезда молодежных научных обществ медицинских и фармацевтических вузов России и стран СНГ Под редакцией В.И. Петрова. 2016. С. 225-226.
6. **Егорова, И. О.** Оценка питьевого поведения крыс на фоне добровольной хронической алкоголизации [Текст] / И. О. Егорова, **Л. П. Кнышова**, А. С. Тарасов // В сборнике: Материалы XIII Съезда молодежных научных обществ медицинских и фармацевтических вузов России и стран СНГ Под редакцией В.И. Петрова. 2016. С. 221-223.
7. **Кнышова, Л. П.** Критерии достоверности воспроизведения экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации [Текст] / Л. П. Кнышова, С. В. Поройский, А. Т. Яковлев, Е. И. Морковин, А. С. Тарасов // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2016. № 4. С. 48-51.
8. **Кнышова, Л. П.** Влияние экспериментальной хронической эндогенной алкогольной интоксикации на микрофлору кишечника [Текст] / Л. П. Кнышова, С. В. Поройский, А. Т. Яковлев, Е. И. Морковин // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2016. № 4 (60). С. 40-44.
9. **Осадченко, Н. А.** Влияние предварительной алкоголизации на ферментативную активность фракции S9 печени [Текст] / Н. А. Осадченко, И. В. Потапова, В. О. Бородин, **Л. П. Кнышова** // В сборнике: Материалы 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – 2017. – С. 611.
10. **Толкачев, Б. Е.** Изменения кишечной микробиоты и биотрансформации ивабрадина у крыс при экспериментальной алкоголизации [Текст] / Б. Е. Толкачев, Е. И. Морковин, Л. П. Кнышова,

А. Т. Яковлев, А. В. Стрыгин // Самарский научный вестник. 2017. Т. 6. № 3 (20). С. 47-51.

11. Поройский, С. В. Синдром эндогенной интоксикации в патогенезе алкогольной интоксикации [Текст] / С. В. Поройский, Л. П. Кнышова, А. Т. Яковлев // В сборнике: БЕЗОПАСНОСТЬ - 2017 Материалы I Межрегиональной научно-практической конференции. 2017. С. 129-130.

12. Яковлев, А. Т. Изменения микробиоты кишечника при хронической алкоголизации [Текст] / А. Т. Яковлев, С. В. Поройский, Л. П. Кнышова, Е. И. Морковин // Самарский научный вестник. 2017. Т. 6. № 3 (20). С. 64-67.

13. Усенкова, А. О. Динамика случаев острых отравлений алкоголем с учетом летальных исходов в Волгоградской области [Текст] / А. О. Усенкова, Н. А. Зарубин, Л. П. Кнышова // В сборнике тезисов: Санкт-Петербургские научные чтения–2017 Материалы VII Международного молодежного медицинского конгресса. 2017. С. 128-129.

14. Кнышова, Л. П. Динамика микробиологических показателей и провоспалительных интерлейкинов при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс [Текст] / Л. П. Кнышова, А. Т. Яковлев, Е. И. Морковин, А. М. Доценко // Врач-аспирант. 2017. Т. 84. № 5. С. 69-75.

15. Тарасов, А. С. Неврологический статус и предпочтение этанола у крыс при формировании алкогольной зависимости [Текст] / А. С. Тарасов, Л. П. Кнышова, Е. И. Морковин, А. Т. Яковлев, С. В. Поройский // Казанский медицинский журнал. 2018;99(3):446-449

16. Приоритет на изобретение: «Способ моделирования экспериментальной хронической алкогольной интоксикации» (№ 2018107103 от 26.02.2018) / С. В. Поройский, А. Т. Яковлев, Л. П. Кнышова, Е. И. Морковин, С. С. Ларионов; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ	–	аланинаминотрансфераза
АсАТ	–	аспартатаминотрансфераза
ЖКТ	–	желудочно-кишечный тракт
КЦЖК	–	короткоцепочечные жирные кислоты
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
ЛПС	–	липополисахарид
СЗА	–	синдромом зависимости от алкоголя
СИБР	–	синдром избыточного бактериального роста
ХАИ	–	хроническая алкогольная интоксикация
ЭИ	–	эндогенная интоксикация
IL-6	–	интерлейкин-6
IL-8	–	интерлейкин-8
TNF- α	–	фактор некроза опухоли
SGLT	–	натрий-зависимые транспортеры глюкозы