

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное учреждение
«Волгоградский медицинский научный центр»**

На правах рукописи

КНЫШОВА
Лилия Петровна

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Яковлев Анатолий Трофимович
Научный консультант:
доктор медицинских наук, доцент
Поройский Сергей Викторович

Волгоград - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Современные медико-социальные аспекты алкоголизма в РФ	15
1.2 Влияние хронической алкогольной интоксикации на состояние иммунной системы и метаболические процессы организма	20
1.3 Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: современное представление, роль в резистентности организма	29
1.4 Моделирование хронической алкоголизации – направление экспериментальной медицины	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1 Характеристика групп экспериментальных животных	44
2.2 Характеристика пациентов	45
2.3 Дизайн исследования	46
2.4 Методы исследования	48
2.4.1 Методика моделирования хронической алкогольной интоксикации у крыс	48
2.4.2 Методика оценки питьевого поведения крыс	49
2.4.3 Методика оценки неврологического статуса крыс	50
2.4.4 Исследование микробиоты кишечника у крыс	52
2.4.4.1 Методика забора кала	52
2.4.4.2 Исследование микрофлоры толстой кишки крыс	52
2.4.5 Методы изучения иммунологических и биохимических показателей крови крыс	56
2.4.5.1 Методы определения содержания цитокинов – IL-1 β , IL-6 и TNF- α в плазме крови крыс	56
2.4.5.2 Методы определения активности ферментов: ЛДГ, АсАТ, АлАТ в плазме крови крыс	57
2.5 Методы статистической обработки результатов исследования	57

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ И КРИТЕРИЕВ ДОСТОВЕРНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ	59
3.1.1 Динамика массы тела у крыс	59
3.1.2 Динамика питьевого поведения у крыс	61
3.1.3 Изменение неврологического статуса	64
3.1.4 Изменение активности ферментов: ЛДГ, АсАТ, АлАТ в плазме крови крыс	65
3.2 ДИНАМИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ	70
3.2.1 Мониторинг микробиоты кишечника во время адаптационного периода	70
3.2.2 Динамика изменения микробиоты при моделировании хронической алкоголизации	71
3.2.3 Динамика сахаролитической микрофлоры при моделировании хронической алкогольной интоксикации	77
3.2.4 Динамика протеолитической микрофлоры при моделировании хронической алкогольной интоксикации	77
3.3 ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-1β, IL-6 И TNF-α В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС	82
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ	85
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Распространенность алкоголизма в России берет начало с XVII века и актуальна в современном обществе. Алкоголизм по праву относят к самым серьезным проблемам современного общества, так как темпы распространения этого заболевания увеличиваются с каждым годом. С 2008 по 2010 год Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) провела масштабные исследования в области потребления алкоголя в странах мира, по результатам которого Россия занимает четвертое место в мире. Статистические данные, полученные Роспотребнадзором в 2017 году, свидетельствуют о том, что к началу года число зависимых от алкоголя граждан достигло 12,5 миллионов. Согласно данным Министерства Здравоохранения Российской Федерации в 2017 году среднестатистический россиянин в год выпивал 15,1 л спиртного. 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].

Злоупотребление алкогольными напитками – фактор демографического и социального кризиса в России, он стал общенациональной угрозой на уровне личности, семьи, общества, государства [Егоров А. Ю., 2002; Яковлева А. В., Софронов Р. П., 2009; Малахова Ж. Л., 2013; Поплавская О. В. и др., 2015]. На данный момент около 60 % лиц, страдающих зависимостью от алкоголя (F 10.2.4.1 – хронический алкоголизм), составляют люди в возрасте от 24 до 30 лет. Свыше 23,5% смертельных случаев происходит в результате неумеренного употребления алкоголя, до 80% убийств совершаются в состоянии алкогольного опьянения. Немаловажная проблема – алкоголизация, которая наблюдается, прежде всего, среди юного поколения. До 85% выпивающих подростков страдают пивным алкоголизмом. В условиях экономического кризиса положение молодежи становится все более неустойчивым, так как социальное неблагополучие сильно отражается на состоянии здоровья этой молодой группы населения, в частности наблюдается рост заболеваемости [Смирнов В. В., 2010; Гостева С. Р., 2011;

Тазуркаев У. И., 2015; Солдатова Е. И., Макарычева Г. Г., 2016]. По этим причинам лечение и профилактика алкоголизма остается актуальной задачей здравоохранения.

В настоящее время алкоголизм официально признан врачами болезнью (F10.2–F11), изменяющей физическое и психическое состояния. Злоупотребление алкоголем отрицательно сказывается на функционировании большинства органов и систем организма в результате токсического действия этанола. Среди висцеральных проявлений хронического алкоголизма преобладают поражения печени, пищеварительного тракта и сердечно-сосудистой системы. 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., Шельгин К. В., 2000; Успенский Ю. П., Балукова Е. В., 2008; . Isolauri E, Kalliomaki M, Laitinen K, Salminen S., 2008].

По количеству отравлений этиловым, Россия, занимает одно из ведущих мест во всем мире. В настоящее время острые отравления этанолом, являются одной из ведущих причин экстренной госпитализации больных токсикологического профиля [Бонитенко Ю. Ю. и др., 2005; Лужников Е. А. и др., 2013]. Следует отметить, что тяжесть клинической картины у данной категории больных определяется не только дозой принятого этанола, но во многом обусловлена поражением органов и систем вследствие хронической алкогольной интоксикации (ХАИ). При этом поздняя диагностика является одной из причин высокой частоты и тяжести соматических осложнений, обусловленных алкогольной интоксикацией [Богомолов Д. В. и др. 2007; Сиволап Ю. П., 2011].

Абсолютное большинство тяжелых расстройств здоровья в результате употребления алкоголя обусловлено систематическим избыточным его приемом, представляющим ХАИ. Диагностика хронического алкоголизма является трудной задачей в практике врача любой специальности и не только потому, что больные

склонны отрицать или занижать реальный объем и частоту потребления алкоголя. ХАИ далеко не всегда сопровождается клинически очевидным алкоголизмом, что ведет к недооценке алкогольной природы обращений за медицинской помощью. Возникающая патология может протекать как бы, не связанная напрямую с алкоголем и не имеющая алкогольной природы (гипертонические кризы, аритмии, пневмонии, судорожный или респираторный дистресс-синдромы, желудочно-кишечные кровотечения и др.), что требует выявления истинной причины болезни во избежание неадекватной или несовместимой с систематическим приемом алкоголя терапии [Огурцов П. П., Жиров И. В., 2002; Пауков В. С. и др., 1991; Кошкина Е. А. и др., 2009]. Диагностика такого рода состояний, в ряде случаев основывается на результатах судебно-химического исследования.

Поражением систем органов при ХАИ вызывает цепочку патологических процессов, приводящих к серьезным структурным и функциональным нарушениям в органах и системах, которые сопровождаются перестройкой обменных процессов, приводя, тем самым, к декомпенсации регуляторных и защитных систем всего организма [Огурцов П. П., Жиров И. В., 2002; Пауков В. С. и др., 1991; Сизова Е. Н., 2005; 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 [Bode C., Bode J. C., 2003].

В число биологических эффектов этанола входят: развитие синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке, 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; Baraona E. et al., 1986; Bode 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 [Bode C., Bode J. C., 2003; L. Bull-Ottersen et al., 2013].

Накопленные данные указывают на способность алкоголя изменять состав микробиоты кишечника [Malaguarnera M. et al., 2007]. Установлена решающая роль метаболита этанола – ацетальдегида в нарушении барьерной функции кишечника [Chen Y. 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. et al., 2005]. Однако результаты представленных работ не могут быть применены для решения проблем диагностики и коррекции лечения 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

1. 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).
2. Впервые проведено изучение динамики изменения кишечной микробиоты при экспериментальной хронической алкоголизации.

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

4. 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, имеющих 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, 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). 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.

Исследование было одобрено Региональным независимым этическим комитетом (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)), протокол № 215-2015 от 8.05.2015 г.

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 клинико-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, использовались современные методы исследования, а также высокотехнологичное оборудование. 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 подготовки 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные медико-социальные аспекты алкоголизма в РФ.

На сегодняшний день проблема алкоголизма актуальна и остается нерешенной как в мире, так и в России [Калинин А. Г., 2002; Leifman Н., 2002; Спектор Ш. И., 2006; Позднякова М. Е. и др., 2011]. В условиях современного общества алкогольная зависимость способствует развитию различных заболеваний, асоциальному поведению, конфликтным ситуациям в семье, на рабочем месте и в обществе в целом [Лисицын Ю. П., 2009; Асотова Т. А., 2011; Навроцкий Б. А., Вешнева С. А., Поплавская О. В., 2015]. В настоящее время, на территории России насчитывается более 12 миллионов граждан с синдромом зависимости от алкоголя (хронический алкоголизм (F10.2.4.1)), что выводит данную проблему в область государственных проблем. По подсчётам независимых экспертов, людей, страдающих алкоголизмом на территории Российской Федерации намного больше, что позволяет рассматривать проблему алкоголизма, как эпидемическое заболевание [Шелыгин К. В. и др., 2004; Россин Н. Г., 2008; Кошкина Е. А. и др., 2011; Ульянова Л. И. и др., 2013]. Некоторые исследователи, считают, что Россия вообще занимает первое место в мире по алкоголизму [Калинин А. Г., 2002; Кошкина Е. А. и др., 2011; Ульянова Л. И. и др., 2013; Анохина И. П., Шамакина И. Ю., 2016].

По данным ВОЗ, алкоголизм является на одной из первых среди причин, приводящих к общему ухудшению здоровья населения в целом. Летальность среди лиц, злоупотребляющих алкоголь, в 2–4 раза выше аналогичного показателя для населения в целом. Высокий показатель смертности связан не только с высоким травматизмом в состоянии алкогольного опьянения, но и с заболеваниями, обусловленными чрезмерным употреблением спиртных напитков, прежде всего, это касается болезней сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта [Минаков С. В., 2009; Немцов А. В., 2010; Ульянова Л. И. и др., 2011]. Кроме того алкоголизм является причиной собственных болезней:

алкогольный цирроз печени, алкогольная кардиомиопатия, алкогольные психозы, алкогольная деградация личности и т.д.

Медико-демографические последствия чрезмерного употребления алкоголя проявляются в снижении общего состояния здоровья, росте заболеваемости, преждевременной смертности населения, которая, в свою очередь, способствует их раннему приобщению к алкоголю. Социальные последствия пьянства и алкоголизма весьма широки. Проблема алкоголизма представляет собой целый комплекс социальных аспектов, которые затрагивают все сферы нормального функционирования общества, которые изучают не только медицинские работники, но и специалисты других направлений [Заиграев Г. Г., 2009; Позднякова М. Е. и др., 2011; Навроцкий Б. А. и др., 2015].

В настоящее время, у лиц, в анамнезе которых присутствовало злоупотребление алкоголем, наблюдается увеличение смертности, как по причине не обращения за медицинской помощью, так и в состоянии алкогольного опьянения. Разная оценка и интерпретация имеющихся клинических и лабораторных признаков, довольно часто, является причиной расхождения судебно-медицинского и патологоанатомического диагнозов, что, в свою очередь, свидетельствует об актуальности, как посмертной, морфологической, так и прижизненной, клинической диагностики, необходимой для проведения своевременных лечебных и реабилитационных мероприятий [Пермяков А. В., Витер В. И., 2002; Кошкина Е. А. и др., 2011; Сиволап Ю. П., 2011; Павлов А. Л., 2014].

В борьбе с алкоголем многие страны применяют медико-социальные методики диагностики для поиска оптимальных решений лечения и восстановления людей с зависимостью от алкоголя [Романов Д. В., 2001; Россин Н. Г., 2008; Смирнов В. В., 2010]. Данные методики, в том числе, направлены на устранение подросткового и детского алкоголизма, т.к. именно эти слои населения с каждым годом пополняют ряды алкогользависимых [Богомоллов Д. Р. и др., 2007; Альтшулер В. Б., 2011; Яковлева Т. В. и др., 2012].

В последние годы алкогольная зависимость значительно возросла среди детского населения и молодежи, в возрасте до 30 лет. Около 82% людей в возрасте от 12 до 22 лет, с той или иной частотой употребляют алкогольные напитки. Статистика употребления алкоголя детьми еще более неутешительна. Средний возраст, в котором подросток начинает потреблять алкоголь, составляет 14 лет. Употребляют алкогольные напитки (включая пиво) ежедневно или через день 33,1% юношей и 20,1% девушек. Доля злоупотребляющих спиртными напитками в школах составляет 15,7%, в ПТУ – 24,4%, в техникумах и колледжах – 33,7%, в вузах – 32,4%. [Шереги Ф. Э. и др., 2001; Щепин О. П., 2001; Менделевич В. Д., 2007; Навроцкий Б. А. и др., 2015].

По сведениям Росстата, за последние 15 лет в России заболеваемость алкоголизмом (F10.2-F11) среди подростков выросла с 18 до практически 21% на 100 тыс. населения, в сравнении с 2000 годом [Лисицин Ю. П., Свиридов П. И., 2009; Высоцкая Т. В., Левченко А. А., 2017]. Сегодня из 1000 подростков более 25 ставятся на диспансерный учет в связи со злоупотреблением алкоголем. О сложившейся в последнее время неблагоприятной ситуации в отношении алкоголя свидетельствует существенный рост алкогольных психозов среди подростков, в 8 раз за последнее 10-тилетие XXI века. Эти цифры являются прогностически неблагоприятным показателем, т. к. алкогольные психозы достаточно редко встречаются в подростковом возрасте и для их развития хронический алкоголизм должен длиться минимум от 2-х до 3-х лет [Кошкина Е. А., 2002; Гоголева А. В., 2003; Менделевич В. Д., 2007; Личко А. Е., Битенский В. С., 2008; Горшков М. К., Шереги Ф. Э., 2010].

Подростковый алкоголизм встречается не очень часто, поскольку как заболевание, алкоголизм развивается в течение определенного промежутка времени, не успевая сформироваться к совершеннолетию. Наиболее актуальной проблемой в этом возрасте является ранняя алкоголизация, которая и приводит к формированию алкоголизма к возрасту от 20 до 22 лет. Ранняя алкоголизация подразумевает знакомство с опьяняющими дозами спиртного в возрасте до 16 лет. Как правило, в этом возрасте клинические проявления алкоголизма

развиваются быстрее, чем у взрослых [Менделевич В. Д., 2007; Личко А. Е., Битенский В. С., 2008; Солдатова Е. И., Макарычева Г. Г., 2016].

Возраст несовершеннолетних, употребляющих спиртные напитки, в России стремительно снижается. За последние десять лет средний возраст первой «пробы» снизился и достиг 15,4 лет. В действительности знакомство с алкоголем нередко происходит и в 11-12-летнем возрасте [Гоголева А. В., 2003; Поплавская О. В. и др., 2015]. Все чаще в ЛПУ поступают пациенты с отягощенной стадией алкоголизма, то есть с психической и/или физической зависимостью.

Злоупотребление алкоголем относится к числу важнейших факторов риска, которые обуславливают возникновение новых и ухудшение прогноза уже имеющихся заболеваний [Korpes L. L. J. et al., 2001; Горшков М. К., Шереги Ф. Э., 2010]. Злоупотребление алкоголем в детском и подростковом возрасте может вызвать: нарушения состояния здоровья, включая несчастные случаи и увечья; сердечно-сосудистые заболевания; заболевания печени и алкогольные психозы; социальные проблемы, включая преступность, жестокость, разрушение семьи, отставание в учебе, проблемы на работе, самоубийства и т.д. [Арзуманов Ю. Л., 2012; Анохина И. П., Шамакина И. Ю., 2016].

В последнее время, все чаще предвестником хронического алкоголизма стало «аддиктивное поведение». Addiction - в переводе с английского языка означает «пагубная привычка», «пристрастие к чему-либо», «порочная склонность». Аддиктивным поведением (addictive behavior) называют злоупотребление различными веществами, изменяющими психическое состояние, до того момента, как от них сформируется физическая зависимость [Минаков С. Н., 2009]. Наиболее часто, аддиктивное поведение характерно современным подросткам. [Шереги Ф. Э., Арефьев А. Л., 2001; Романов Д. В., Горпиненко С. В., 2001; Личко А. Е., Битенский В. С., 2008; Минаков С. Н., 2009; Андрющенко И. В., Малинина Е. В., 2011; Самарина Д. А., 2014]. Подросткам, зависимым от алкоголя характерна агрессия, как естественное состояние жизнедеятельности, а также замедленное умственное развитие. В силу отсутствия жизненного опыта, под действием спиртных напитков подросток не способен к самоконтролю, а

кризис подросткового возраста может проявить еще одну психологическую особенность опьянения: жестокость. Общий анализ статистических данных на территории Российской Федерации за 2016 года о преступности, причиной которой стал алкоголь свидетельствует: 55% краж совершено на фоне алкогольного опьянения, 80% грабежей, разбойных нападения в статистике 70%, изнасилования 80%, и убийства 80% [Кибитов А. О., Шувалов С. А., 2013; Самарина Д. А., 2014; Можаров Н. С., 2013; Высоцкая Т. В., Левченко А. А., 2017].

Основная опасность массового явления алкогольной зависимости детей в том, что для несформированного организма любая доза алкоголя может быть очень опасной. Алкоголизм, как правило, системная патология, которая сопровождается поражением различных органов и тканей в той или иной степени [Спектор Ш. И. и др., 2007; Солдатова Е. И., Макарычева Г. Г., 2016]. Учитывая токсическое воздействие спиртного, у подростка после нескольких приемов алкоголя может развиваться множество заболеваний. Пубертатный период, характеризуется целым рядом анатомо-физиологических изменений в организме, что являются своеобразной благоприятной почвой, для быстрого развития алкогольобусловленной патологии. При этом, большое значение имеет степень алкоголизации, формы употребления спиртных напитков, частота, концентрация алкоголя и ответная реакция организма на его прием [Бабаян Э. А. и др., 2001; Ерышев О. Ф. и др., 2002]. Алкогольная зависимость в подростковом возрасте формируется в среднем в течение 3–4 лет. Клинические проявления, такие как абстинентный синдром, появляются спустя 1–3 года после начала постоянного употребления спиртного. Отличительной особенностью раннего алкоголизма, является его зависимость от преморбидных особенностей подростка, в частности от типа акцентуации личности. Так, при эпилептоидном типе у подростка быстро проявляется нарастающая озлобленность, появляется склонность сочетать алкоголь с другими дурмаными средствами (ацетон, клей), употреблять суррогаты алкоголя [Личко А. Е., Битенский В. С., 2008; Сиволап Ю. П., 2009]. Опасность детского алкоголизма заключается в том, что именно в подростковом

возрасте происходит формирование личности. Об актуальности данного вопроса свидетельствуют огромное количество публикаций.

Социальный ущерб, проявляющийся во всем негативном многообразии, сводится к следующему: криминализация общества; деформация общественных ценностей; ухудшение демографических показателей (в том числе ранняя смертность и снижение рождаемости в ближайшем будущем) [Сирота Н. А. и др., 2008; Солдатова Е. И., Макарычева Г. Г., 2016].

Проблемы диагностического плана, при всем многообразии изучения патогенетических звеньев формирования алкоголизма, связаны с определенными проблемами с классификацией данной нозологии. В настоящее время нет четкой, научно-обоснованной концепции развития синдрома зависимости от алкоголя, ещё меньше публикаций, касающихся этиопатогенеза хронической алкогольной интоксикации, их дифференциальной диагностики. Большинство работ освещают лишь морфологические поражения тех или иных органов [Пауков В. С. и др., 1991; Огурцов П. П., Нужный В. П., 2001; Казанцева Ю. В., 2010; Павлов А. Л., 2014; Высоцкая Т. В., Левченко А. А., 2017], но нет комплексных исследований. Следствие этого – отсутствие единых схем и методов лечения и профилактики хронического алкоголизма.

1.2 Влияние хронической алкогольной интоксикации на состояние иммунной системы и метаболические процессы организма

Злоупотребление алкоголем в целом негативно сказывается на общем состоянии и функционировании органов и систем человеческого организма в результате токсического действия этанола [Сирота Н. А. и др., 2008; Анохина И. П. и др., 2011; Ульянова Л. И., 2013; Кошкина Е. А. и др., 2016]. Среди висцеральных проявлений хронического алкоголизма преобладают поражения печени, пищеварительного тракта и сердечно-сосудистой системы. Патологические изменения, развивающиеся во внутренних органах при алкоголизме, связывают с прямым (метаболические, тканевые и адаптационные

расстройства) и косвенным (в связи с травмами, снижением функций иммунной системы и повышенной чувствительностью к инфекциям) воздействием алкоголя [Кирпич И. А., Шелыгин К. В., 2000; Успенский Ю. П., Балуква Е. В., 2008; Анохина И. П., 2011; Ульянова Л. И., 2013; Isolauri E, Kalliomaki M, Laitinen K, Salminen S., 2008]. Злоупотребление алкоголем, усиливает эти нарушения и может привести к возникновению иммунодефицитного состояния [Ульянова Л. И., 2013; Singh A.K. et al., 2007]. В следствии чего, лица, злоупотребляющие алкоголем, входят в группу повышенного риска возникновения туберкулеза [Mason C. M. et al., 2004], онкологических заболеваний [Ульянова Л. И., 2013; Dossow V. et al., 2004], вирусных гепатитов В и С [Zhang T., 2006] и ВИЧ-инфекции [Должанская Н. А., Бузина Т. С., 2011; Ульянова Л. И., 2013; Aloma C. et al., 2007].

С развитием обменных сдвигов в организме связывают толерантность больных к различным препаратам (барбитуратам, некоторым сердечным гликозидам) и как следствие – неэффективность проводимого лечения. У некоторых больных развивается гломерулонефрит и почечная недостаточность. В печени нарушается аминокислотный обмен, угнетается синтез белка, повышается уровень триглицеридов и всех липопротеиновых фракций в сыворотке [Андрушкевич В. В., 2006; Альтшулер В. Б., 2010].

Иммунная система, как и другие системы организма, подвергается пагубному воздействию алкогольной интоксикации [Гамалея Н. Б., Ульянова Л. И., 2011; Ульянова Л. И., 2013]. Несмотря на многочисленные проведенные исследования, роль иммунной системы в патогенетических механизмах алкогольной интоксикации, особенно у лиц без сопутствующей патологии органов и систем, не страдающих аллергическими, аутоиммунными, онкологическими заболеваниями, туберкулёзом и другими инфекциями, мало изучена [Ульянова Л. И., 2013]. Согласно исследованиям отечественных и зарубежных авторов, злоупотребление алкоголем способствует в 2–3 раза более частому развитию заболеваний центральной нервной системы у лиц с алкогольной зависимостью [Альтшулер В. Б., Лукин А. А., 2006; Мартынов М. Ю., 2006; Кошкина Е. А. и др., 2011; Ульянова Л. И., 2013]. Злоупотребление

спиртным влияет на определенные системы и структуры мозга, вызывая синдром зависимости, являющийся одним из первостепенных в клинической картине алкоголизма [Вышинский К. В. и др., 2011; Ульянова Л. И., 2013; Кошкина Е. А. и др., 2016].

Регулярное употребление в больших количествах алкоголя, приводит к формированию хронической алкогольной интоксикации (ХАИ), за счет нарушения дегидрогеназных систем, предназначенных для окисления поступающего алкоголя и его метаболитов. Роль ХАИ в развитии соматоневрологической патологии прослеживается в Международной классификации болезней и причин смерти, связанных с употреблением алкоголя (МКБ-10).

Однако, соматических заболеваний на высоте алкогольобусловленной интоксикации организма наблюдается намного больше, приводя к возникновению органной и системной патологии. Всесторонний анализ патогенеза ХАИ демонстрирует наличие различных видов и проявлений повреждений органов и тканей, которые приводят к компенсируемым и некомпенсируемым нарушениям функции этих органов. Компенсаторные процессы, в свою очередь, вызывают каскад вторичных трофических нарушений и, как следствие, – развитие нового цикла патологических процессов в органах и системах организма. [Альтшулер В. Б., 2010; Арзуманов Ю. Л., 2012; Огурцов П. П. и др., 2012; Ульянова Л. И., 2013; Donohue T. M. Jr., 2009; Szalay F., 2003; Szuster-Ciesielska A. et al., 2000; Моисеев В. С., Гармаш И. В., 2014].

Результаты целого ряда проведенных исследований, свидетельствуют о том, что ХАИ способствует возникновению большого числа заболеваний не имеющих алкогольной природы. В данном случае, поступивший в организм этанол, выступает в качестве пускового фактора, в отношении большинства патологических состояний (Таблица 1).

Таблица 1 – Патология с повышенным относительным риском возникновения на фоне хронической алкогольной интоксикации, но не имеющая алкогольной природы, согласно МКБ-10

Нервная система Менингит Геморрагический инсульт Синдром Марчафава-Биньями (расплавление мозолистого тела с деградацией личности и быстрым летальным исходом) Бессонница Ночное апноэ Эпилепсия
Сердечно-сосудистая система Артериальная гипертензия Синдром «праздничного сердца» Синдром сердечной недостаточности
Дыхательная система Пневмония Гнойные заболевания легких (абсцесс, эмпиема) Бронходеформирующие заболевания (деформирующий бронхит, бронхоэктазы) Туберкулез легких
Пищеварительная система Острый панкреатит Синдром Зиве (сочетание тяжелой гипохромной анемии, поражения печени, гиперлипидемии с последующим развитием психоорганического синдрома) Синдром Мэллори-Вейса (линейные разрывы слизистой оболочки и подслизистого слоя на стыке пищевода и желудка с возникновением кровотечения) Синдром Берхава (разрыв всех слоев пищевода с развитием интрамуральной гематомы) Рефлюкс-эзофагит Рак ротоглотки, пищевода, печени Затяжное и осложненное течение язвенной болезни Синдром нарушенного всасывания (мальабсорбция)

<i>Продолжение таблицы 1</i>	
Эндокринная система и метаболизм	
Ожирение Гипогонадизм – снижение либидо, тестикулярная атрофия, олигоспермия, снижение оволосения по мужскому типу Феминизация – гинекомастия, оволосение и распределение жира по женскому типу Нарушения менструального цикла Гипогликемия Остеопороз Подагра Асептический некроз шейки бедра Рак молочной железы	
Почки и урогенитальная система	
IgA-нефрит Импотенция	
Кожа и подкожная клетчатка	
Псориаз Абсцессы, флегмоны	
Кровь	
Тромбоцитопения	
Взаимодействие лекарственных веществ и алкоголя	
Склонность к непереносимости лекарств Снижение эффективности лекарственной терапии	
Травмы, отравления, несчастные случаи	

Обращения по поводу перечисленной патологии, особенно лиц молодого трудоспособного возраста, должны быть поводом для проведения дополнительной диагностики с учетом возможного «алкогольного» анамнеза пациента. Чаще всего состояние ХАИ проявляется комплексом физических и лабораторных симптомов, встречающихся при систематическом массивном употреблении алкоголя и отражающих его органические последствия [Огурцов П. П., Жиров И. В., 2002]. В условиях ХАИ в организме происходит цепочка патологических процессов. Так называемая перестройка его метаболизма приводит к глубоким структурным и функциональным нарушениям системах

органов, сопровождающаяся, как перестройкой обменных процессов, так и последующей декомпенсацией защитных систем организма [Сизова Е. Н., 2005]. Таким образом, первичное поражение систем детоксикации, в результате непосредственного влияния этанола, а также их вторичное поражение токсическими продуктами извращенного метаболизма приводят к изменению гомеостаза [Пауков В. С. и др., 1991; Сизова Е. Н., 2005].

Одно из главных мест, среди множества причин, вызывающих изменение нормального гомеостаза организма, принадлежит эндоинтоксикации. Как известно, под эндогенной интоксикацией (ЭИ) понимают состояние, обусловленное деструктивными процессами, в результате которых в жидкостях и тканях организма накапливаются промежуточные и конечные продукты нормального обмена веществ, а также продукты нарушенного метаболизма соединительной ткани, продукты жизнедеятельности бактерий и антигены, в нефизиологических концентрациях, которые оказывают токсическое влияние и вызывают нарушения в функционировании различных органов и систем [Яковлев М. Ю., 1988; Огурцов П. П., 1998; Анненкова А. Б., 2006]. Общим для большинства заболеваний, сопровождающихся развитием синдрома ЭИ, является отдаленность его проявлений от момента воздействия этиологического фактора, что обусловлено наличием огромного числа приспособительных механизмов и систем регуляции, благодаря которым сохраняется постоянство внутренней среды организма и поддерживается его равновесие с внешней средой в условиях действия патологического фактора [Симбирцев С. А., Беляков Н. А., 1994].

Результаты большого числа исследований свидетельствуют о том, что токсическому воздействию алкоголя подвержены различные органы и ткани организма. Воздействуя на митохондрии, алкоголь нарушает проницаемость мембран, изменяет проводимость нервных импульсов. Под длительным действием алкоголя в организме нарушается синтез белков, углеводов, жиров, а также ферментный метаболизм.

Токсикогенная стадия острого алкогольного отравления характеризуется серьезными расстройствами гомеостаза, которые связаны преимущественно с

нарушениями водно-электролитного баланса и кислотно-основного состояния [Ботиненко Ю. Ю. и др., 2005; Маткевич Ю. А., Остапенко Ю. И., 2013]. Эти нарушения на ранних сроках интоксикации обусловлены нарушениями центрального генеза, вследствие поражения желудка и поджелудочной железы, проявляющимися многократной рвотой, которая приводит к потере жидкости, электролитов и развитию гипо- и нормотонической дегидратации. Также проявлениями нарушения кислотно-основного состояния являются метаболический или смешанный ацидозом, вследствие угнетения дыхательного центра, увеличения «мертвого пространства» и аспирации [Маткевич Ю. А., Остапенко Ю. И., 2013; Барканов В. Б. и др., 2015]. Данные нарушения лежат в основе развития синдрома ЭИ, который не только усугубляет течение наркологического заболевания, но может приобретать самостоятельное значение, представляя для организма большую опасность, нежели первичный процесс, его обусловивший [Яковлев М. Ю., 1988; Сизова Е. Н., 2005; Сперанский И. И. и др., 2009].

Этиловый спирт быстро всасывается в кровь из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (причем 20% в желудке и основное количество 80% в тонкой кишке), достаточно равномерно распределяясь по органам и тканям организма. Выделяют две четко выраженные фазы в токсикокинетике этанола: резорбции (всасывания) и элиминации (выделения). В фазе резорбции преобладает насыщение этанолом органов и тканей. Биотрансформация этанола и его выделение в эту фазу незначительны, что приводит к повышению его концентрации в крови. Такие органы как, мозг, печень и почки, обладающие интенсивным кровоснабжением, насыщаются этанолом в первую очередь с установлением динамического равновесия уровня этанола в крови и тканях. На скорость резорбции влияют характер и объемы пищи в желудке, замедляющие всасывание этанола. В случае при приеме натощак или при повторных приемах алкоголя, а также у лиц имеющих заболевания желудка скорость резорбции выше [Маткевич Ю. А., Остапенко Ю. И., 2013; Сабаев А. В. и др., 2013].

В молодом возрасте часто страдает поджелудочная железа. Употребление больших количеств алкоголя нередко приводит к некротическим процессам поджелудочной железы, заканчивающиеся смертью [Огурцов П. П., Жиров И. В., 2002; Тазуркаев У. И., 2015].

Этанол является одновременно источником химической энергии и сильным фармакологическим агентом. Его избыточное поступление в организм блокирует или нарушает функционирование отдельных реакций метаболизма, изменяет всасывание и транспорт многих незаменимых нутриентов. Развивающиеся метаболические сдвиги сами становятся механизмом, усугубляющим первоначальную патологию. Доказано, что поступление этанола в организм в дозах, не вызывающих прямого повреждения тканей, но, тем не менее, приводящих, к различного рода расстройствам, начинается с действия на клетку. В случае систематического приема алкоголя достаточно продолжительные функциональные нарушения на клеточном уровне – причина возникновения соматических поражений при хроническом алкоголизме.

Этанол, как известно, является источником ацетальдегида, который, обладает высокой химической активностью, что способствует его взаимодействию с нейрехимическими медиаторами, гормонами, витаминами, белками, иммуннокомпетентными молекулами, усиливая их биологическую активность [Попов В. Ф., Толстихин О. Н., 2005; Тарасов Ю. А., Лелевич В. В., 2011].

Метаболизм этанола происходит в печени с помощью нескольких механизмов. Первый механизм преобладает у здоровых людей. С его помощью в цитоплазме гепатоцитов под влиянием фермента алкогольдегидрогеназы (АДГ) в присутствие кофермента НАД⁺ этанол преобразуется в альдегид с образованием НАДН-Н⁺. Второй механизм заключается в окислении этанола с помощью микросомальной этанолокисляющей системой в печени. Эта система связана с мембранами эндоплазматической сети. Так же для ее работы необходим цитохром P450. Для здоровых людей эта система является вспомогательной и работает только при очень большом количестве алкоголя. Третий механизм присущ в

основном людям, больным алкоголизмом. С его помощью этанол окисляется перекисью водорода до уксусного альдегида и воды. Действующие при этом ферменты – это каталазы, оксидазы и пероксидазы тканей [Шабанов П. Д. Калишевич С. Ю., 1998; Сурцукова М. О., 2016]. Ацетальдегид, в свою очередь, подвергается преобразованиям при участии альдегиддегидрогеназы (АлДГ). При этом образуется ацетил-КоА (Рисунок 1).

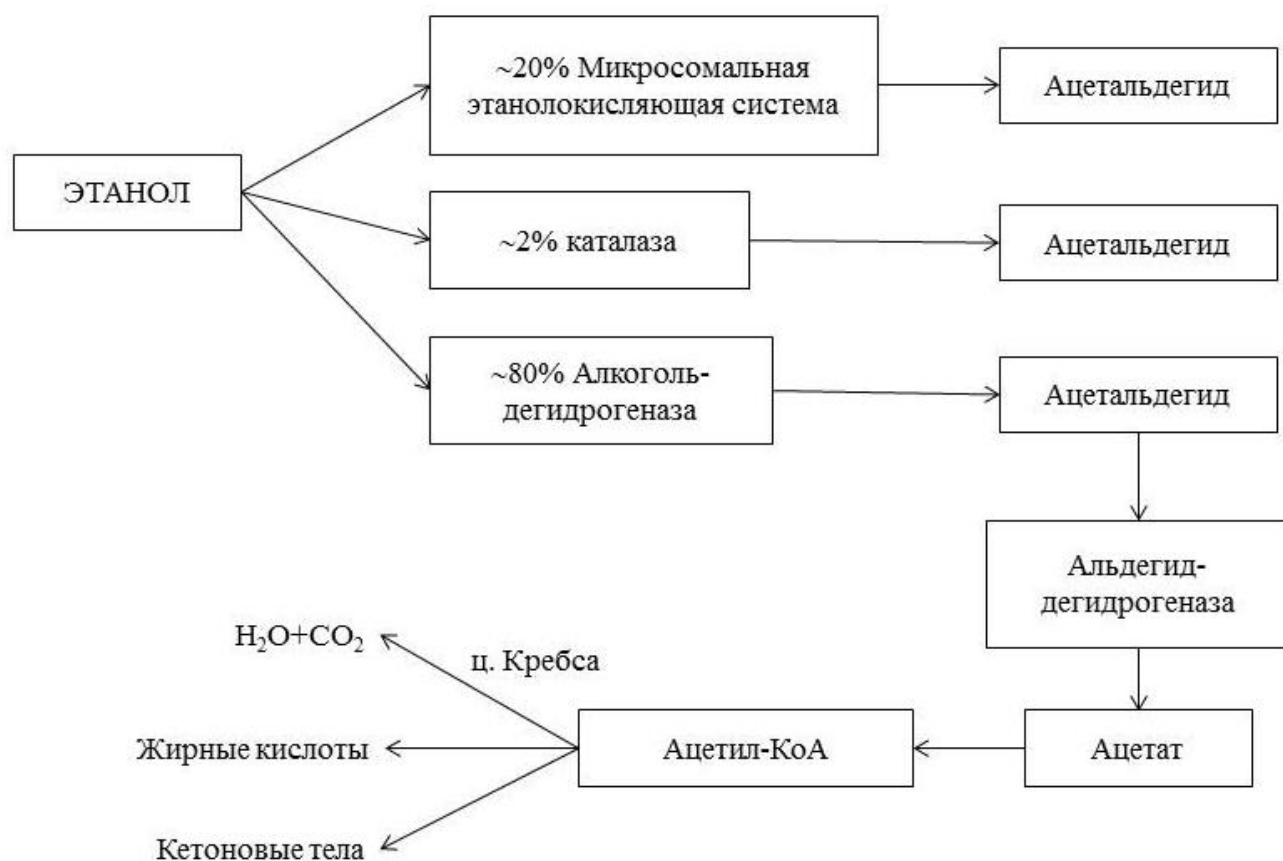


Рисунок 1 – Три метаболических пути окисления этанола до ацетальдегида.

Даже при эпизодическом употреблении спиртных напитков этанол способен конкурировать с углеводами, липидами и некоторыми аминокислотами за ферменты основного обмена веществ, нарушая метаболические процессы организма. Употребление, например, 25 г водки увеличивает его концентрацию в клетках почти в 100 раз по сравнению с его природным уровнем. Соответственно,

активность ферментов, реагирующих на этанол, растет и начинает формироваться антифосфолипидный синдром (АФС) на этанол, включающий в этот процесс ферментативные цепи основного обмена веществ [Попов В. Ф., Толстихин О. Н., 2005; Кошкина Е. А. и др., 2009].

Таким образом, алкоголь оказывает широкое пагубное воздействие на весь организм в целом. Особенно отрицательное влияние алкоголь оказывает на растущий организм в подростковый период, ослабляя и угнетая правильное развитие и созревание буквально всех органов и систем детского организма. Это связано с анатомо-физиологическими и социально-психологическими особенностями детского и пубертатного возраста. В частности, бурно протекающие, в период полового созревания, изменения центральной нервной и эндокринной систем, а также изменения во внутренних органах способствуют повышению реактивности организма, в связи с чем алкоголь может стать причиной быстрого развития того или иного патологического процесса [Кирпич И. А., Шелыгин К. В., 2000; Попов В. Ф., Толстихин О. Н., 2005; Урсова Н. И., Горелов А. В., 2006; Успенский Ю. П., Балукова Е. В., 2008; Isolauri E, et al., 2008].

1.3 Микробиоценоз желудочно-кишечного тракт: современное представление, роль в резистентности организма.

Защитно-приспособительную основу организма составляет естественная резистентность, которая определяет общее состояние организма и его способность сопротивляемости к воздействию различных факторов внешней среды. В условиях клиники состояние резистентности организма определяет степень выраженности патологического процесса, а также может отражать эффективность проводимого лечения. Следовательно, определение состояния системы общей сопротивляемости организма и ее коррекция в процессе лечения имеет большое практическое значение [Крамарь В. С. и др., 2010; Ардатская М. Д. и др., 2015].

Особое место в структуре резистентности занимает дисбаланс микробиоценозов различных органов и систем человеческого организма. Как известно, все микроорганизмы, обитающие в том или ином биотопе, находятся между собой в сложных симбиотических взаимоотношениях, которые связаны с синтезом различных факторов адаптации и антагонистической активности [Бухарин О. В., 2012; Бондаренко В. М., Мацулевич Т. В., 2007; Tannock G. W., 1995]. Научные достижения и клинические наблюдения отечественных и зарубежных исследователей в изучении микробиома, свидетельствуют о том, что микробиоценоз макроорганизма является своеобразным экстракорпоральным органом, играющим важную роль в физиологии человека. Любое изменение в балансе между микробиотой и макроорганизмом может привести к заболеванию. В последние годы определились области, в которых от состояния микробной флоры, выраженности ее нарушений, напрямую зависят успех и сама возможность проведения лечения основного заболевания [Шумилов П. В., 2010; Крамарь Л. В., Крамарь О. Г., 2015; Алешукина А. В. и др., 2015; Hentges D. J., 1983].

Наиболее представительной и значимой для человека является микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). ЖКТ человека населен многочисленными микроорганизмами, метаболизм которых тесно интегрирован в метаболизм макроорганизма [Rolfe R. D., 1984; Крамарь Л. В., 2002; Бондаренко В. М., 2011]. В 2006 г. Goodacre R. введено понятие «суперорганизм», под которым он понимает сообщество человека и населяющих его микроорганизмов [Goodacre R., 2007], причем доля собственно человеческих клеток в нем составляет всего лишь 10%, а 90% принадлежат бактериям [Костюкевич О. И. и др., 2016; Turnbaugh P. J. et al., 2007]. Общеизвестно, что синдром дисбактериоза кишечника (ДК) различной степени выраженности, сопряженный с угнетением отдельных звеньев иммунной системы и факторов неспецифической резистентности организма, в значительной степени ухудшает течение основного заболевания [Сиротинин И. Н., 1981; Бондаренко В. М., Воробьев А. А., 2004].

Роль микробиоты ЖКТ обоснована в большом числе современных работ отечественных и зарубежных исследователей: Минушкин О. Н. с соавт (1999); Щербаков П. Л. с соавт. (2001); Бухарин О. В. с соавт. (2004, 2010); Бондаренко В. М. с соавт. (2003, 2007, 2011); Чернин В. В. с соавт. (2011); Macfarlane G. T. (1997); Gibson G. R. et al. (1999); Bode C. et al. (2003); Chen Y. et al. (2011); Falony G. et al. (2016); Fung T. C. et al. (2017).

Кишечная микробиота обладает огромным метаболическим потенциалом и способна осуществлять множество биохимических процессов [Костюкевич О. И. и др., 2016]. Она расходуется на питание около 20% питательных веществ, поступающих в кишечник, и 10% энергии [Шендеров Б. А., 1998].

Роль микробиоты кишечника сложно недооценить т.к. она участвует в целом ряде процессов: регуляции газового состава кишечника и других полостей организма; морфокинетическом действии; продукции биологически активных соединений, таких как витамины, антибиотики, гормоны и др.; принимает участие в обмене холина, регуляции желчных кислот, холестерина; выполняет мутагенную/антимутагенную роль; детоксикацию экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов; активирует деятельность щитовидной железы [Бондаренко В. М., Мацулевич Т. В., 2007; Бондаренко В. М., Рябиченко Е. В., 2007; Парфенов а. И., Бондаренко В. М., 2012; Sansonetti P., 2004; Verda E. F., Collins S. M., 2004; O'Hara, Shanahan F., 2006].

Биоценоз ЖКТ оказывает существенное влияние на водно-солевой обмен, участвуя в процессах всасывания воды, электролитов и других неорганических соединений из кишечного содержимого. Микроорганизмы, присутствующие в кишечнике, активно участвуют в поддержании рН содержимого толстого кишечника на уровне 7,2–7,4 [Воробьев А. А. и др., 2001; Buts P. et al., 2006]. Это достигается за счет продукции анаэробными микроорганизмами летучих жирных кислот и регуляции содержания в просвете бикарбоната. Давление кислорода на поверхности слизистой толстой кишки, стабильная величина и составляет 85–100 мм ртутного столба, которая достигается за счет продукции микроорганизмами летучих жирных кислот и их перемещения через слизистую, сопровождающуюся

связыванием кислорода, поступающего в эту область по капиллярам. Анаэробноз в этой области также поддерживается разнообразными процессами анаэробного дыхания, за счет использования в качестве конечного акцептора электронов нитратов, нитритов, сульфата и сульфита [Янковский Д. С., 2005].

Важнейшей функцией нормальной микробиоты кишечника является ее участие в формировании колонизационной резистентности в кишечнике, которая заключается в предотвращении колонизации ЖКТ условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, что в конечном итоге обеспечивает устойчивость человека к инфекциям [Барановский А. Ю., Кондрашина Э. А., 2008; Бондаренко В. М., 2011]. Антагонистический эффект нормальной микробной флоры, на котором базируется колонизационная резистентность, ассоциированная с влиянием представителей микробиоты кишечника, основан на различных механизмах: конкуренция за питательные вещества, витамины и рецепторы адгезии; синтез и высвобождение органических кислот, сероводорода, перекиси водорода, антибиотикоподобных веществ, обладающих бактериостатическим и бактерицидным эффектом, которые препятствуют росту патогенных микроорганизмов [Бондаренко В. М., 2011; Костюкевич О. И. и др., 2016; Waaij D., 1983; Montiel-Castro A. J. et al., 2013].

Другой механизм колонизационной резистентности микроорганизмов кишечника, лежащий в основе иммуномодулирующего свойства микробиоты, связан с их способностью вызывать значимую неспецифическую стимуляцию гуморального и клеточного иммунитета [Шумилов П. В., 2010; Elmer G. W. et al., 1999]. Слизистая оболочка кишечника, обладающая собственной лимфоидной тканью, известной как GALT (gut-associated lymphoid tissue), является одним из важных компонентов иммунной системы организма, т.к. в ней локализовано около 80% иммунокомпетентных клеток [Костюкевич О. И. и др., 2016]. Кишечная микробиота воздействует на специфические скопления лимфоидной ткани, усиливая фагоцитарную активность макрофагов, моноцитов и гранулоцитов, стимулируя пролиферацию плазматических клеток, увеличивая синтез цитокинов и клеточных иммунных механизмов защиты. Клетки иммунной

системы кишечника активно вырабатывают IgA, участвующий в обеспечении местного иммунитета и являющийся важнейшим маркером иммунного ответа [Беляев И. М., 1997; Saavedra Jose M., 2000]. В работах *in vivo* на животных, которые были выращены в стерильных условиях, была продемонстрирована важность микробиоты, было выявлено, что постоянная стимуляция иммунной системы кишечника крайне важна для созревания и нормального функционирования иммунитета, формирования иммунной толерантности к антигенам индигенной микрофлоры и пищи [Шумилов П. В., 2010]. У безмикробных животных (гнотобионтов) отмечено низкое количество пейеровых бляшек и снижение уровня секреторного IgA. Наблюдалось снижение количества гранулоцитов, а имеющиеся клетки были не способны к фагоцитозу. Лимфоидные структуры организма экспериментальных безмикробных животных были недоразвиты, реакция гиперчувствительности замедленного типа Т клеток, которых, была снижена или нарушена вовсе [Шумилов П. В., 2010; MacDonald T. T., Carter P. B., 1979]. Однако, сразу после того как была произведена подсадка стерильным животным представителей нормальной кишечной микробиоты (лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков) у них наблюдалось развитие иммунных структур GALT [Шумилов П. В., 2010]. Таким образом, микробиота участвует в формировании как местного, так и системного иммунитета [Костюкевич О. И. и др., 2016; Шендеров Б. А., 2008].

Обладая высокой метаболической активностью кишечная микробиота выполняет одну из важнейших функций – синтез короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК): уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислоты и их изомеров. КЦЖК, в свою очередь, участвуют как в регуляции кишечного микробиоценоза, так и в поддержании гомеостаза макроорганизма. Так, распад КЦЖК обеспечивает кишечный эпителий дополнительной энергией и является важным фактором регуляции пролиферации и дифференцировки клеток толстой кишки [Булатова Е. М. и др., 2009; Шумилов П. В., 2010].

Каждый индивид, считается уникальным по составу кишечной микробиоты, которая изменяется в популяции и зависит как от генетических факторов, так и от

особенностей питания [Костюкевич О. И. и др., 2016; Ley R. E. et al., 2008]. Но наиболее часто встречающимися представителями нормальной кишечной микробиоты человека являются анаэробные сахаролитические бактерии: бифидобактерии (*Bifidobacterium spp.*) и лактобактерии (*Lactobacillus spp.*).

Известно, что лактобактерии, способные выделять различные бактериоцины, низин, диплоцин, лактострепцин, гелветицин, лактобревин и др., способны блокировать синтез чувствительных к ним макромолекул клеток, что является проявлением антимикробного эффекта, за счет подавления метаболизма клеток. Это лежит в основе широкого спектра антимикробной активности. Таким образом, лакторактерии, ингибируют рост и размножение бацилл, клостридий, стрептококков, стафилококков, энтеробактерий, псевдомонад, листерий и грибов рода кандиды.

Ацидофильные лактобактерии подавляют синтез РНК, ДНК, белка и различных адаптивных ферментов клеток, способствуя прекращению их роста и размножения. Таким образом, они ингибируют рост кампилобактерий и холерных вибрионов [Шендеров Б. А., 1998; Зверева В. В., Бондаренко В. М., 2001; Федорова Е. Р., Валеева Ю. В., 2013; Бойченко М. Н., 2016].

Бифидобактерии обладают антимикробной активностью в отношении энтеробактерий, вибрионов, стрептококков и стафилококков, выделяя бифидин, бифилонг. Бактерии, обитающие в кишечнике человека, выделяют полимиксины, колистин, эффективные против грамотрицательных бактерий, а бацитрацин, грамицидин, субтилин, бутирозин, активны в отношении грамположительных.

Молочнокислые бактерии в процессе своей жизнедеятельности способны выделять перекись водорода, которая также приводит к гибели вирусов в организме человека. Такие представители нормофлоры кишечника, как лактобациллы, энтеробактерии выделяют лизоцим, способный расщеплять пептидогликан грамположительных бактерий. В свою очередь, пептидогликаны и другие продукты, образуемые грамположительными бактериями, активно участвуют в регуляции иммунного статуса организма человека, способны оказывать адьювантный и митагенный эффекты, активировать комплемент,

индуцировать выработку специфических антител. К повреждению мембран различных клеток и тканей организма человека могут привести экзотоксины микробов, оказывающие токсическое действие на ткани и органы человека, посредством наличия фосфолипазной, коагулазной, гиалуронидазной, липазной и дезоксирибонуклеазной активности [Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., 1997; Бондаренко В. М., 2007; Федорова Е. Р., Валеева Ю. В., 2013].

Синтетическая функция микрофлоры кишечника в том, что она обеспечивает синтез многих макро- и микронутриентов: витаминов группы В, С, К; никотиновую кислоту, пиридоксин, фолиевую кислоту [Бережной В. В. и др., 2004].

Микробные токсины (экзо- и эндотоксины) и различные факторы патогенности микроорганизмов (патогенных, условно-патогенных, непатогенных) также принимают участие в развитии эндогенной интоксикации. Из литературных источников известно, что в настоящее время получены новые данные, в корне меняющие устоявшиеся представления о механизмах взаимодействия бактерий-комменсалов и макроорганизма. Появились научные доказательства того, что эти бактерии, обладающие малой вирулентностью и патогенностью, при наличии факторов риска с учетом морфофункциональных особенностей органов, способны обуславливать развитие патофизиологических процессов в органах и системах организма [Кнышова Л. П., Яковлев А. Т., 2016; Vollard E. J. et al., 1987].

Большой практический интерес, в последнее время, представляет феномен бактериальной транслокации — процесс проникновения бактерий из кишечника во внутреннюю среду организма. Транслокация бактериального липолисахарида (ЛПС), источником которого являются грамотрицательных бактерий, колонизирующие кишечник, в системный кровоток, приводит к повреждению паренхиматозных органов, что является одним из факторов в патогенезе эндогенной интоксикации [Бондаренко В. М., Лиходед В. Г., 2009; Zabolotskikh I. B., Golubtsov V. V., 2006]. Транслокацию бактерий рассматривают как патологический процесс, развивающийся вследствие стресса, иммунодефицитного состояния, интоксикации организма, гематологических

изменений и т.д. Таким образом, дисбиотические нарушения в микробиоценозе ЖКТ, снижают детоксикационную функцию индигенной флоры, увеличивают функциональную нагрузку на печень, что, в свою очередь, ведет к повреждению гепатоцитов [Несвижский Ю. В. и др., 2007]. К патологическим процессам, развивающимся в печени, обусловленным транслокацией кишечной микробиоты, относят целый ряд заболеваний: неалкогольный стеатоз, стеатогепатит, неспецифический реактивный гепатит, внутрипеченочный интралобулярный холестаз, печеночно-клеточная дисфункция, воспалительные процессы и дискинетические нарушения внепеченочного билиарного тракта [Федина Р. Г. и др., 2010; Гриневич В. Б. и др., 2012].

Усиление трансмембранной транслокации, обусловленное преобладанием условно патогенных энтеробактерий, приводит к усилению продукции провоспалительных цитокинов. Основная роль в биотопах кишечника принадлежит IL-1 β , ответственному за ответ на внедрение патогенна. Снижение колонизационной резистентности с последующей транслокацией бактерий и их токсинов через поврежденный кишечный барьер приводит к увеличению синтеза цитокинов, попадающих в циркуляции, что приводит, в свою очередь, к системной воспалительной реакции в виде острофазного ответа организма [Бондаренко В. М., Рябиченко Е. В., 2007; Бондаренко В. М., Лиходед В. Г., 2009].

Результаты многочисленных исследований подтвердили влияние острой эндотоксемии, приводящей к дисбиотическим нарушениям микробиоценозного комплекса кишечника, на увеличение степени тяжести ЭИ организма. Таким образом, проведение анализа индексов интоксикации и состояния микробной флоры кишечника позволяют оценить динамику изменения иммунной системы и эффективность проводимого лечения. В тоже время, дисбиоз кишечника может рассматриваться как один из важных этапов патогенеза системных метаболических нарушений, требующих своевременной коррекции [Парфенов А. И. и др., 2003; Митрохин С. Д., 2004].

Нарушение микробиоты кишечника может стать одним из потенциальных звеньев, ведущих к ЭИ при хроническом употреблении этанола [Лейхтер С. Н. и

др., 2004]. Алкоголь приводит к избыточному бактериальному росту и тем самым способен существенно изменить количественный и качественный состав микрофлоры кишечника [Бакулин И. Г., Шаликиани Н. В., 2016; Минушкин О. Н. и др., 2017]. Этот факт неоднократно был продемонстрирован в различных исследованиях. Например, J. C. Vode и соавт. (1998) обнаружили увеличение общего числа бактерий с преобладанием анаэробных микроорганизмов, в аспирате тощей кишки почти у половины больных алкоголизмом [Bode Ch., Schäfer C., 1998]. Аналогичные результаты получены Т. Nauge и соавт., (1997), обнаружившими избыточный рост бактерий в двенадцатиперстной кишке больных алкоголизмом [Nauge T. et al., 1997]. Наличие синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) описано также в экспериментальных моделях алкогольной болезни печени [Berg R. D., 1995; Yan A. W. et al., 2011].

Известно, что посредством ферментации клетчатки, сахаролитическая микробиота кишечника, способствует образованию КЦЖК, которые понижают рН кишечника, препятствуют развитию патогенной флоры и являются маркерами нормального функционирования кишечника [Ардатская М. Д., 2003; Лейхтер С. Н. и др., 2007; Clausen M. R., Mortensen P. B., 1995; Drewnowski A., Rolls B. J., 2012]. Образующиеся под воздействием патогенной протеолитической микробиоты продукты распада белков и аминокислот – индол, скатол и фенол, – помимо многих физиологических эффектов, активизируют кишечную перистальтику, что ухудшает всасывание питательных веществ [Богданова Н. М. и др., 2009; Людина А. Ю., Бойко Е. Р., 2013]. Тем самым, дисбиотические нарушения микробиоты кишечника приводят к снижению количества КЦЖК и уменьшают экспрессию рецепторов-сенсоров жирных кислот, которые лежат в основе инкретинового пути, чем могут приводить к снижению секреции и продолжительности действия инсулина, вызывая различные патологии углеводного обмена [Samuel B.S. et al., 2008].

Алкоголь увеличивает рН в просвете толстого кишечника, что может изменить конкурентное преимущество соотношения различных бактериальных сообществ [Топчий Т. Б. и др., 2017]. Например, содержание в кишечной

микробиоте *Alcaligenes faecalis* (тип протеобактерий), выживающих в условиях повышенного pH, увеличивается [Bode C. et al., 1993].

Прием алкоголя может увеличивать проницаемость кишечной стенки [Loguercio C. et al., 2005]. Исследования показывают, что решающую роль в нарушении барьерной функции кишечника играет продукт метаболизма этанола – ацетальдегид. В условиях интенсивного роста бактерии начинают усиленно метаболизировать этанол, в результате чего, как в просвете кишечника, так и в портальном кровотоке повышается концентрация ацетальдегида [Лейхтер С. Н., Лебедева О. В., 2005; Baraona E. et al., 1986; Bode Ch., Schäfer C., 1998]. Ацетальдегид воздействует на белки плотного и адгезионного контакта, которые сохраняют целостность кишечной стенки и препятствуют проникновению макромолекул через эпителиальный слой [Тарасов Ю. А., Лелевич В. В., 2011]. Под действием ацетальдегида возрастает проницаемость слизистой тонкой кишки для макромолекул бактериальных токсинов, которые, в свою очередь, могут активировать печеночные макрофаги [Ergerer G. et al., 2005; Hauge T., Persson J., Danielsson D., 1997; MacGregor R. R., 1986; MacGregor R. R., Louria D. B., 1997; Balzan S., et al., 2007] и способствовать высвобождению медиаторов воспаления (цитокинов), а также реактивного кислорода, которые, в свою очередь, могут вовлекаться в патогенез формирования цирроза печени [Алешукина А. В. и др., 2012; Ergerer G. et al., 2005].

Таким образом, влияние микробиоты ЖКТ на поддержание здоровья человека, его биохимического, метаболического и иммунного равновесия доказано большим количеством экспериментальных работ и клинических наблюдений отечественных и зарубежных исследователей. Очевидно, что дисбиотические нарушения микробиоты, состояние иммунного статуса и проявление болезни следует рассматривать в совокупности, причем пусковым механизмом в каждом конкретном случае может быть любой из этих компонентов: дисбиоз, иммунный статус и патологический процесс [Воробьев А. А. и др., 1997; Алешукина А. В., 2012]. Роль микробиоты кишечника в патогенезе многих заболеваний (атеросклероз, ожирение, синдром раздраженного

кишечника, неспецифические воспалительные заболевания кишечника, целиакия, колоректальный рак и др.) продолжают активно изучать. Поэтому проблема коррекции нарушений микробиоты кишечника, является проблемой сохранения здоровья человека, формирования здорового образа жизни.

1.4 Моделирование хронической алкоголизации – направление экспериментальной медицины

Общие биологические закономерности влияния этанола на человека и животных обосновывают экспериментальное моделирование состояний алкоголизации организма [Шелыгин К. В. и др., 2002]. Соответственно, эти модели могут рассматриваться в качестве адекватных для поиска потенциальных средств лечения алкоголизма и экстраполяции полученных данных на человека. Однако, моделирование такого многофакторного заболевания, как алкоголизм, в эксперименте на животных представляет значительную проблему. Ряд причин, способствующих формированию и развитию этого заболевания, представлен различными социально-экономическими факторами, воспроизведение действия которых на животных моделях представляется невозможным. В тоже время этиловый спирт при однократном введении является активным веществом с широким спектром фармакологической активности и оказывает сходное действие на организм в целом как человека, так и животных, что позволяет использовать этологические и общебиологические подходы в экспериментальной работе [Каркищенко Н. Н., 2003].

Исследования патогенеза алкоголизма с использованием разнообразных методических подходов делает возможным выявление существенных биологических факторов заболевания на уровне метаболических систем, эндокринных расстройств, изменений в сфере модуляции и медиации нервных импульсов в ЦНС и некоторых других факторов. Подобный комплексный подход позволяет более дифференцированно оценить вклад тех или иных систем организма в развитие патологического процесса. В последние несколько десятилетий предложены и активно разрабатывается целый ряд

экспериментальных моделей различных форм алкоголизации или осложнений организма. Таким образом, успех в понимании механизмов патогенеза алкоголизма в значительной степени зависит от адекватности выбранных экспериментальных моделей [Буров Ю. В., 1985; Каркищенко Н. Н., Грачева С. В., 2010; Dyr W., 2004; Koob G. F., 2006].

Впервые опыты по изучению влияния алкоголя на организм лабораторных животных стали проводить в 40-х годах прошлого века. Уже тогда Spanagel R., Holter S. M. установили, что, несмотря на аверсивный вкус, которым обладает этанол, некоторые виды грызунов добровольно употребляют алкоголь в лабораторных условиях [Spanagel R., Holter S. M., 2000]. Эти наблюдения сделали возможным использование крыс и мышей в качестве объектов для изучения различных аспектов потребления алкоголя человеком.

В начале 70-х годов, David Lester и Earl Freed сформулировали несколько критериев моделирования алкоголизма у животных, основным из которых является оральное потребление алкоголя без пищевой или водной депривации. Помимо этого, алкогольная интоксикация должна присутствовать на протяжении длительного периода, сопровождаться формированием синдрома отмены и развитием физической зависимости. После отмены алкоголя и угасания реакции, связанной с его потреблением (фаза угасания), следует повторный эпизод интоксикации, который должен приводить к увеличению потребления алкоголя, так называемому рецидиву (фаза восстановления) [Lester D., Freed E.X., 1973].

Наиболее распространенным способом моделирования алкогольного абстинентного синдрома в эксперименте является метод разработанный Majchrowicz [Virmani M. et al., 1985]. Для этого на протяжении 5 дней 2 раза в сутки с интервалом в 12 часов животным интрагастрально вводят 25% раствор этанола в дозе 4,5-5 г/кг. Животных декапитируют через 3–4 ч, 1, 3 и 6 суток после введения этанола. Недостатком этой модели является исследование сугубо постинтоксикационных нарушений метаболизма.

Одной из самых известных и простых в воспроизведении методик является модель добровольного потребления алкоголя в двухбутылочном тесте. Животным

предоставляется свободный доступ к двум бутылкам, одна из которых содержит раствор этанола (обычно 9–10%), а другая – воду. Доступ к алкоголю может быть свободным, т.е. животное имеет свободный доступ к алкоголю в любое время, или ограниченным, например, доступ осуществляется только в определенное время суток. Выработка парадигмы свободного выбора используется в качестве средства оценки общей аддиктивности алкоголя [Tabakoff B., Hoffman P. L., 2000]. К недостаткам данного метода можно отнести недостаточную точность измерения потребления [Heilig M., Koob G. F., 2007] и отсутствие каких-либо измерений мотивационного компонента поведения [Tabakoff B., Hoffman P. L., 2000].

Также известен способ моделирования прерывистой алкогольной интоксикации у крысы в эксперименте, заключающийся в том, что 2 раза в сутки внутрижелудочно животным вводят 25% раствор этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела в течение четырех суток, а затем воду в эквивалентном количестве в течение трех суток, цикл введений повторяют 4 раза [Лелевич В. В., Лелевич С. В., 2011]. Предлагаемая модель соответствует прерывистому режиму алкоголизации, который является самой распространенной из реально встречающихся ситуаций среди множества форм употребления алкоголя в обществе. Однако недостатком данного способа является отсутствие критериев достоверности длительной (хронической) алкогольной интоксикации как срока начала проведения лабораторных исследований.

Известна также традиционно применяющаяся методика моделирования длительной (хронической) алкогольной интоксикации, заключающаяся в алкоголизации животных с помощью средних доз этилового спирта, получаемых животными перорально на протяжении хронического эксперимента, в зависимости от его задач и составляют [Нужный В. П., 1999]. Продолжительность хронического эксперимента колеблется от 5 суток до 4 лет также в зависимости от целей исследования. Недостатком указанного способа является, применение 40% этанола, что усложняет способ моделирования длительной (хронической) алкогольной интоксикации крыс 1,5–3 месяцев, сопровождающийся развитием острого отравления вплоть до коматозного состояния и скорой гибели животных.

Наиболее подходящий по совокупности существенных признаков моделирования длительной (хронической) алкогольной интоксикации, является использование метода искусственной полидипсии, при котором животные вынуждены употреблять 20% раствор этанола в течение 35 суток в качестве единственного источника жидкости. Алкоголизация крыс с использованием данного метода приводит к нарушению питьевого поведения, которое заключается в многократных на протяжении всего времени суток подходах к поилке при сокращении разовых объемов потребляемой жидкости. Моделирование хронической алкогольной интоксикации позволяет получить характерные патологические изменения, сравнимые с таковыми у человека при длительном злоупотреблении алкоголем [Шекунова Е. В. и др., 2015]. Недостатком данного способа является отсутствие критериев достоверности длительной (хронической) алкогольной интоксикации как срока начала проведения лабораторных исследований.

Таким образом, в зависимости от целей эксперимента модель развития алкоголизма у животных может обладать внешней или предиктивной валидностью, что в первом случае, подразумевает наличие феноменологических свойств между моделью и моделируемым состоянием, а во втором, отражает вероятность того, что результаты, полученные при ее использовании, могут быть получены в клинических условиях у человека.

Таким образом, на основании литературных данных видно, что этанол приводит к развитию патологических процессов в разных органах и тканях организма за счет своих физико-химических свойств и особенностей биологического и токсического действия. При систематическом употреблении этанол, который действует на нервную систему человека угнетающе, в отличие от большинства других психоактивных веществ, с большей долей вероятности приводит к развитию зависимости. Также этанол способен существенно изменить количественный и качественный состав микробиоценоза человеческого организма, метаболизм которого, тесно интегрирован в метаболизм всего организма человека. Это ведет к изменению метаболизма макроорганизма и

может стать причиной других заболеваний.

Очевидно, что на сегодняшний день не существует модели потребления алкоголя животными, которая бы идеально отражала симптоматику формирования и развития хронического алкоголизма у человека, что, в свою очередь, стимулирует разработку новых или модернизацию уже известных моделей на животных.

В связи с вышеизложенным, нами была разработана экспериментальная модель хронической алкогольной интоксикации, обладающая высокой воспроизводимостью, позволяющая изучить метаболические нарушения в условиях, максимально приближенным к реальным.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика групп животных.

Исследование выполнено на базе вивария Научно-исследовательского института фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета на 80 самцах крыс линии Вистар (ветеринарное свидетельство 234 №6595160 от 26.09.2016 г.), масса – $170\text{--}250 \pm 25$ г (ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России, г. Волгоград). После доставки из специализированного питомника животные в течение 2-х недель находились на карантинном режиме, в стандартных условиях вивария, с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Животные содержались в полипропиленовых клетках (435x275x155 мм, Тип Т/4В, ООО «МЭСТ», г. Москва) на подстиле из стружек мягких пород дерева, по 5–6 особей в стандартных условиях вивария с температурой воздуха $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажностью 40–60%. Световой цикл в помещениях был инвертирован для исключения негативного влияния суточных биоритмов на пищевое и питьевое поведение животных [Когаладзе Р. А., 2004; Каркищенко Н. Н., Грачева С. В., 2010]. Экспериментальные группы формировались по истечению карантинного периода (2 недели) и оценки общего состояния крыс с использованием метода случайного распределения по группам. Исследовательские манипуляции выполняли в один и тот же период суток для сведения к минимуму влияния суточных биоритмов на результаты.

Эксперименты проводились в соответствии с правилами лабораторной диагностики (GLP), с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», с ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с ГОСТ Р 51000.4-2011 «Общие требования к аккредитации испытательных лабораторий», «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)», с соблюдением Международных

рекомендаций «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) и были одобрены Региональным Независимым Этическим Комитетом (ГБУ Волгоградский Медицинский Научный Центр) (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)): протокол № 215-2015 от 8 мая 2015. Эвтаназия при выведении животных из эксперимента выполнялась путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг.

2.2. Характеристика пациентов

Научно-исследовательская работа проводилась в период с 2015 по 2017 гг. на базе ГБУЗ «Волгоградская областная наркологическая больница» города Волгограда.

Выполненная работа не ущемляла права, не подвергала опасности обследованных пациентов и осуществлялась с их добровольного письменного информированного согласия на участие в исследовании. Одобрена локальным этическим комитетом ВолгГМУ.

Выборка больных с синдромом зависимости от алкоголя (СЗА) (хроническим алкоголизмом (F10.2.4.1)) была сформирована в соответствии с критериями включения и исключения.

Критерии включения: пациенты в возрасте от 19 до 30 лет с СЗА и диагнозом хронический алкоголизм; наличие информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие других тяжелых хронических заболеваний; отягощенного аллергологического анамнеза; хронических заболеваний ЖКТ, печени, почек, крови; хирургические вмешательства на ЖКТ (за исключением аппендэктомии); острых инфекционных заболеваний менее чем за 4 недели до начала исследования; прием лекарственных препаратов, биологически активных добавок и нутриентов, оказывающих влияние на качественный и количественный состав кишечной микробиоты менее, чем за 30 дней до начала исследования; участие пациента в других клинических

исследованиях в течение месяца до включения в данное исследование; отказ от участия в исследовании.

В исследование не были включены лица, принадлежащие к группам, участие которых в исследованиях запрещено (заключённые, военнослужащие, контингент интернатов для инвалидов и т.п.).

Проведен анализ клинической ситуации и данных лабораторных методов исследования 12-ти больных с СЗА. Исследовалась взаимосвязь изменений микробиоты кишечника и клинических данных с результатами иммунологических исследований.

2.3. Дизайн исследования

На первом этапе исследования нами изучены этапы (Рисунок 2), определяющие достоверность результатов и позволяющие выработать объективные критерии эффективности экспериментального воспроизведения модели хронической алкоголизации у изучаемых объектов. В качестве критериев использовалась оценка динамики массы тела, питьевого поведения и выраженность неврологического дефицита.

На втором этапе, с целью подтверждения достижения хронической стадии алкоголизма организма животного была произведена оценка динамики изменения лабораторных показателей иммунной системы при моделировании хронической алкоголизации у экспериментальных животных, включавшая оценку активности ферментов крови: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ), аланинаминотрансфераза (АлАТ) и содержание провоспалительных цитокинов: интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α) в плазме крови крыс.

На третьем этапе мы проводили оценку микробиологического статуса на высоте алкогольобусловленной интоксикации при экспериментальной хронической алкоголизации.



Рисунок 2 – Дизайн экспериментального изучения состояния микробиоты кишечника на фоне хронической алкоголизации

2.4. Методы исследования

2.4.1. Методика моделирования хронической алкогольной интоксикации у крыс

В работе нами была разработана модель хронической алкогольной интоксикации у крыс. Животные были взяты в возрасте 3 и 6 месяцев, что обусловлено сравнимостью алкогольобусловленных изменений у крыс с таковыми у человека, морфофизиологическими особенностями этих животных.

Животные были рандомизированы и разделены на 4 группы в соответствии с возрастом: I контрольная группа (n = 10) – животные в возрасте 3 месяцев соответствует 10 годам у человека, II контрольная группа (n = 10) – животные 6 месяцам, что соответствует 18 годам у человека, III экспериментальная группа (n = 30) – животные 3 месяцев, IV экспериментальная группа (n = 30) – животные 6 месяцев (Таблица 2).

Таблица 2 – Количественная характеристика экспериментальных животных.

№ группы	Наименование группы	Возраст животных (мес.)	Количество животных (n)
I	Контрольная	3 месяца	10
II	Контрольная	6 месяцев	10
III	экспериментальная группа (животные с моделированием ХАИ)	3 месяца	30
IV	экспериментальная группа (животные с моделированием ХАИ)	6 месяцев	30

Контрольные (интактные) группы составляли животные, не подвергавшиеся никакому дополнительному 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 производства ОАО «Медхимпром», Балашиха, Московская обл., Россия, в течение 40 суток.

2.4.2 Методика оценки питьевого поведения крыс

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 (Рисунок 3). 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 ($D = 100\% * V_{\text{алк}} / V_{\text{общ}}$) [Егорова И. О., Кнышова Л. П., Тарасов А. С., 2016].

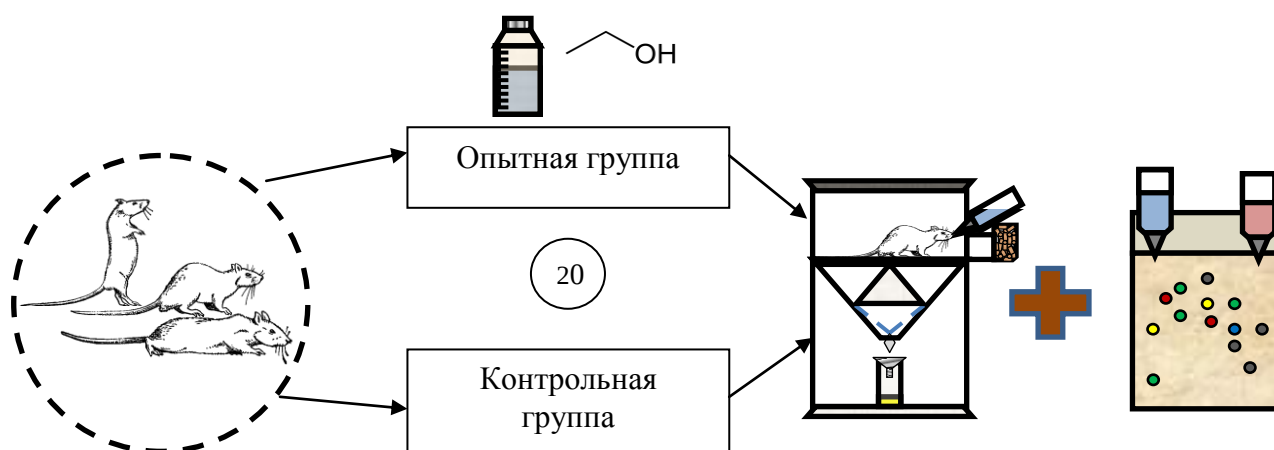


Рисунок 3 – Схема проводимого теста предпочтения алкоголя.

2.4.3 Методика оценки неврологического статуса крыс

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], ранее применявшаяся в ряде исследований, посвящённых нарушениям мозгового кровообращения (Таблица 3).

Таблица 3 – Модифицированная шкала тяжести неврологической симптоматики [Chen J. et al., 2001].

Тест	Баллы	Проявления	Баллы
Подвешивание за хвост	0 – 3	Подгибание передней конечности	1
		Подгибание задней конечности	1
		Смещение головы $> 10^\circ$ от вертикальной оси в течение 30 секунд	1
Двигательная активность	0 – 3	Без особенностей	0
		Невозможность движения по прямой	1
		Манежность	2
		Падение на одну из сторон	3
Сенсорные тесты	0 – 2	Тест постановки передней конечности	1
		Соппротивление пассивному сгибанию конечности в голеностопном суставе	1
Хожение по перекладине	0 – 6	Устойчивая поза	0
		Зажимание одной из сторон перекладины	1
		Обхватывание перекладины с соскальзыванием одной из конечностей	2
		Обхватывание перекладины с соскальзыванием двух конечностей или вращение на перекладине (> 60 с)	3

		<i>Продолжение таблицы 3</i>	
		Безуспешная попытка удержаться на перекладине, падение (> 40 с)	4
		Безуспешная попытка удержаться на перекладине, падение (> 20 с)	5
		Падение без попыток повиснуть или удержаться на балке (< 20 с)	6
Выпадение рефлексов, специфические движения	0 – 4	Рефлекс наружного слухового прохода	1
		Роговичный рефлекс	1
		Стартл-рефлекс	1
		Судороги, миоклонусы, мышечная дистония	1

В соответствии с данной шкалой проводили подвешивание животных за хвост (для выявления парезов и параличей), оценивали двигательную активность в домашней клетке (выявление нарушений походки и стереотипных движений) и особенности хождения по горизонтальной балке (оценка координации движений), проверяли сохранность основных рефлексов (стартл-рефлекс, рефлекс наружного слухового прохода, роговичный рефлекс) [Тюренков И. Н. и др., 2018].

Выводы о наличии неврологического дефицита делали на основании суммы баллов, набранных в каждом тесте: 1–6 баллов соответствуют лёгкому, 7–12 – умеренному, 13–18 – тяжёлому неврологическому дефициту.

2.4.4 Исследование микробиоты кишечника у крыс

2.4.4.1. Методика забора кала

Фекалии собирали непосредственно из прямой кишки 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.

2.4.4.2 Исследование микробиоты толстой кишки

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. Габрического и оценивали по отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003) [Бондаренко В. М., Лиходед В. Г., 2007].

После поступления материала в лабораторию и его регистрации производили навеску на лабораторных весах до 1 г. Навеску фекалий массой 1 г переносили в стерильную пробирку, гомогенизировали в 9,0 мл физиологического раствора (NaCl 0,9 %), в соотношении 1:10 (вес/объем), оставляли на 10 мин для осаждения на дно крупных частиц. Затем готовили исходное разведение материала (10^{-1}). Содержимое контейнера тщательно перемешивали стеклянной палочкой и оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. Из исходного разведения делали высеив на среды, обычно используемые для выделения патогенных энтеробактерий и жидкие среды обогащения для выделения патогенных кишечных палочек. Из исходных готовили ряд последующих разведений материала в физиологическом растворе до 10^{-9} , 10^{-10} . Каждое разведение кала готовили новой стерильной пипеткой. Из приготовленных разведений делали дозированные посеив на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов (Таблица 4). На плотные среды в чашках Петри наносили 0,1 мл взвеси из соответствующих разведений с последующим втиранием материала шпателем, для получения роста изолированных колоний. В жидкие, полужидкие и плотные среды, разлитые в пробирки высоким столбиком, вносили 1,0 мл взвеси на 9,0 мл среды. Все посеив инкубировали при +37°C 24–48 ч; чашки со средой Сабуро оставляли после этого еще на двое суток при комнатной температуре 18–24°C. Для культивирования анаэробных микроорганизмов использовали микроанаэроостаты системы GasPak в присутствии палладиевых катализаторов и индикаторных ризазуриновых систем (OXOZD, Англия). Посевы инкубировали не менее двух суток.

Таблица 4 – Среда и условия культивирования, использованные при изучении кишечной микробиоты

Микроорганизмы	Среда	Время, условия культивирования
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Блаурокка	48 ч., анаэробное, +37°C
<i>Lactobacterium spp.</i>	МРС - 4	48 ч., анаэробное, +37°C
<i>Escherichia coli</i> (включая гемолизирующие штаммы)	Эндо, Эндо с 2,5% кровью	24 ч., аэробное, +37°C
<i>Enterococcus spp.</i>	Эндо, Висмут-сульфит агар	24 ч., аэробное, +37°C
<i>Staphylococcus spp.</i>	ЖСА	48 ч., аэробное, +37°C
Дрожжеподобные грибы <i>Candida spp.</i>	Сабуро	2-5 сут. аэробное, +30°C
<i>Proteus spp.</i>	Плоскирева, Скошенный агар по Шукевичу	24 ч., аэробное, +37°C

После инкубирования чашек на каждой питательной среде с посевами подсчитывали количество микроорганизмов каждого вида (колониеобразующие единицы – КОЕ) и пересчитывают на 1 г исследуемого материала (КОЕ/г) с использованием формулы:

$$K = E : (kvn),$$

где К – количество бактерий; Е – сумма колоний данного вида во всех используемых разведениях; к – количество чашек данного разведения; v – объем суспензии нанесенной на чашку; n – степень разведения.

Посевы для выделения *Bifidobacterium spp.* производили на среде «Блаурокка» (ООО «Эпидбиомед», г. Москва), из 10^{15} , 10^{17} и 10^{19} разведений методом высоких агаровых столбиков. Инкубировали при +37,5–38,0°C в течение 48 часов. Из последнего разведения с характерным для бифидобактерий ростом, пипеткой Пастера отбирали колонии, а при равномерном помутнении среды забор проводили со дна пробирки. Затем готовили мазки, которые окрашивали по

Граму. Идентификацию бифидобактерий проводили по культуральным, морфологическим и тинкториальным. В агаре бифидобактерии образуют характерные колонии, напоминающие гречишные зерна или в форме дисков. В мазках бифидобактерии обычно расположены в форме «китайских иероглифов», имеют вид прямых или разветвленных грамположительных палочек, нередко с утолщениями на концах.

Для выделения *Lactobacterium spp.* использовали питательную среду для культивирования лактобактерий: МРС-4 (НПЦ «Гидробиос», г. Москва). Посев производили из разведений 10^3 , 10^5 и 10^7 в полужидкую среду, разлитую в пробирки высоким столбиком. Для того, чтобы избежать роста сопутствующей микрофлоры, в среду добавляли сорбиновую кислоту. Инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. После инкубации производили подсчёт колоний, готовили мазки. Лактобактерии – это грамположительные, палочковидные бактерии. Микроаэрофилы. Не обладают каталазой и оксидазой, неподвижны, спор не образуют.

Enterococcus spp. выделяли на среде Эндо (Агар Эндо сухой; ГНЦПМ «Питательные среды», г. Оболенск). Посевы на данную среду делали по 0,05 мл (1 капля) из разведений 10^5 и 10^7 . При учете отмечали отдельно лактозонегативные (Lac^-) и лактозопозитивные (Lac^+) кишечные палочки. Учитывая, что на данной среде растут и другие бактерии, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, и др.), бактерии из нетипичных для кишечных палочек колоний для первичной идентификации пересевали на агар Клиглера–ГРМ (ООО «Эпидбиомед», г. Москва). Дальнейшую идентификацию энтеробактерий проводили по их биохимическим свойствам с помощью мультимикротестсистем ММТ Е24 (ООО НПО «Иммунотэкс», г. Ставрополь). Принадлежность к виду осуществлялась на основании тинкториальных и биохимических свойств.

Для выделения *Staphylococcus spp.* использовали среду желточно-солевой агар (ООО «Арт-Медика», г. Екатеринбург). Данная среда обладает высокой селективностью для стафилококков, благодаря содержанию высокой концентрации NaCl (10%). Высев исследуемого материала на данную среду

осуществляли по 0,05 мл из разведения 10^1 и 10^3 . Инкубировали 24–48 часов при $+37^\circ\text{C}$. На желточно-солевом агаре стафилококки дают колонии с желтой пигментацией и зоной помутнения с перламутровым оттенком вокруг колонии за счет лецитиназной активности. По морфологии – это грамположительные кокки, располагающиеся скоплениями, напоминающие гроздья винограда. Для подтверждения принадлежности бактерий к виду *S. aureus* проводили тесты на выявление плазмокоагулазы, гемолизинпродуцирующей активности, способности сбрасывать глюкозу в анаэробных условиях.

Для выделения дрожжеподобных грибов рода *Candida* использовали среду №2 ГРМ (Сабура) (ООО «Эпидбиомед», г. Москва). из 10^1 и 10^3 разведений, чашки инкубировали 24 часа при $+37^\circ\text{C}$ и 24 часа при комнатной температуре. Учитывали количество выпуклых колоний белого или кремового цвета плотной консистенции. При микроскопии определяли крупные грамположительные почкующиеся клетки округлой или удлинённой формы, которые относили к дрожжеподобным грибам рода *Candida*.

РН фекалий определяли с помощью универсальных лакмусовых бумажек.

Количество бактерий в 1 г биологического материала вычисляли по числу выросших колоний микроорганизмов (КОЕ) при посеве из максимального разведения, где отмечался рост не менее 10 колоний.

2.4.5 Методы изучения иммунологических и биохимических показателей

2.4.5.1. Методы определения содержания цитокинов – IL-1 β , IL-6 и TNF- α в плазме крови крыс

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 температуре +25°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).

2.4.5.2 Методы определения активности ферментов ЛДГ, АсАТ, АлАТ в плазме крови крыс

Определение активности ферментов: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), аспаратаминотрансфераза (АсАТ), аланинаминотрансфераза (АлАТ) в плазме крови проводили стандартными биохимическими методами («Ольвекс диагностикум») с использованием реагентов «Диакон-ДС» (Россия) на фотометре СФ-26 (Россия).

2.5. Методы статистической обработки результатов исследования

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.

Таким образом, с целью создания модели хронической алкогольной интоксикации у животных, нами был выполнен эксперимент на самцах крыс линии Вистар. Оценка физического состояния животных, их неврологического статуса, поведенческих реакций проводили в течение всего эксперимента. Микробиологический анализ проводили при поступлении животных, до начала эксперимента (истечению срока карантина) и в конце эксперимента. Биохимические параметры, включающие оценку активности основных ферментов печени и измерение концентраций противовоспалительных цитокинов, оценивали в конце эксперимента. Полученные результаты были обработаны современными методами параметрической и непараметрической статистики.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ И КРИТЕРИЕВ ДОСТОВЕРНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

3.1.1 Динамика массы тела у крыс

За время проведения экспериментального исследования гибели животных зарегистрировано не было. В ходе нашей работы производился контроль массы тела как экспериментальной, так и контрольной групп животных.

В ходе эксперимента было отмечено увеличение масса тела крыс контрольной группы на 34,4%, относительный прирост массы тела после «добровольной» хронической алкоголизации (экспериментальная группа) составил 16,9% (Рисунок 4). При этом динамика прироста массы тела животных обеих групп носила линейный характер с 3-х до 20-х суток эксперимента. Особенности динамики массы тела крыс, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации, наглядно иллюстрирует график абсолютного прироста массы (Рисунок 5).

В течение начальных 20 суток эксперимента у животных, подвергнутых «добровольной» хронической алкоголизации, прирост массы тела характеризовался плавным и равномерным увеличением; 30-е сутки характеризовались интенсивным снижением массы тела, что подтверждает достижение состояния хронической алкогольной интоксикации.

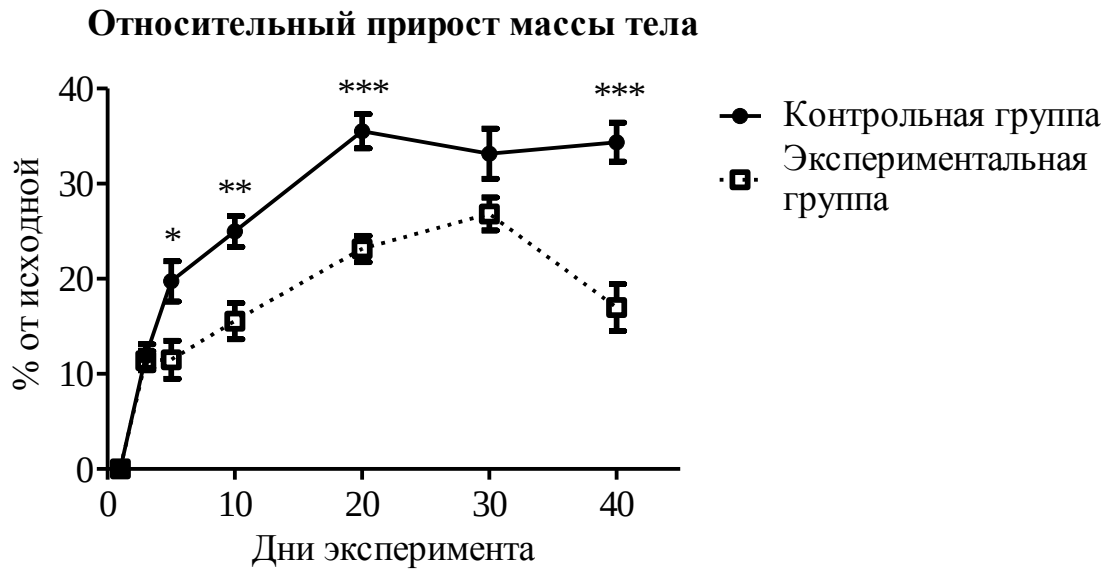


Рисунок 4 – Динамика относительного прироста массы тела крыс, подвергнутых алкоголизации, и крыс контрольной группы

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

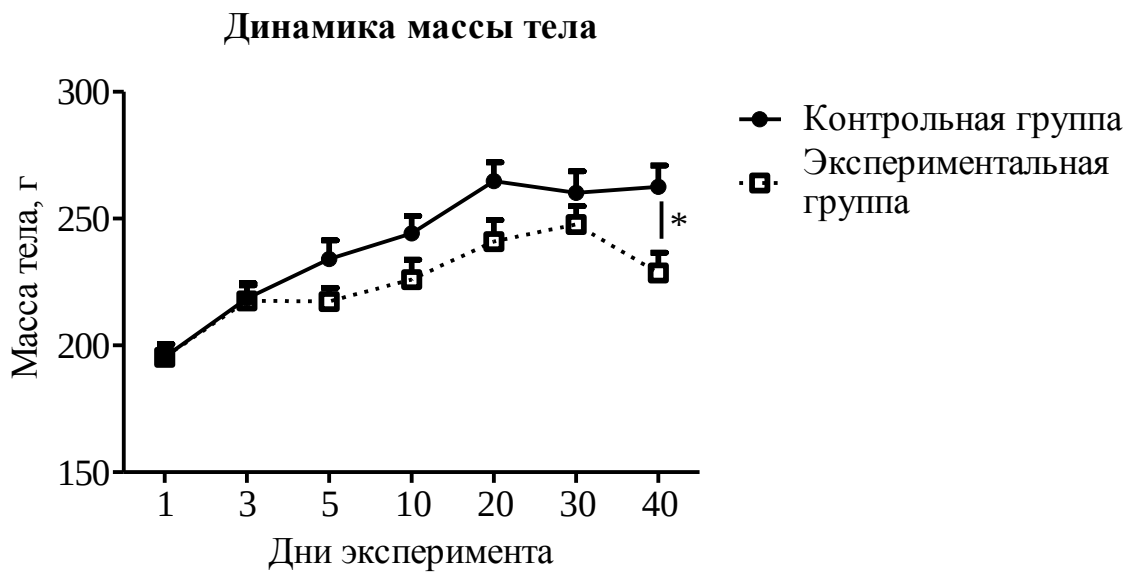


Рисунок 5 – Динамика изменений массы тела крыс, подвергнутых алкоголизации, и крыс контрольной группы

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; * – $p < 0,05$.

Оценка результатов динамики относительного прироста массы тела крыс, подвергнутых экспериментальному моделированию хронической алкогольной интоксикации, проводилась с учетом токсического действия этилового спирта и продуктов его метаболизма на организм. С этих позиций можно объяснить особенности динамики в начале эксперимента, характеризующейся увеличением массы тела на протяжении первой половины эксперимента и её интенсивного уменьшения после 20-х суток. Полученные данные соответствуют характерной клинической картине алкогольной зависимости у человека, характеризующейся значительной потерей массы тела, связанной с угасанием пищевого поведения. Это объясняется тем, что алкоголь представляет собой более экономичный источник энергии для организма по сравнению с другими пищевыми продуктами, катаболизм которых требует значительно больших энергетических затрат [Ерохина Л. Г., 1988; М. Г. Чухрова М. Г., Леутин В. П., 2007]. Этот феномен связан с тем, что этанол, подвергаясь последовательным реакциям с участием алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы, превращается в ацетил-КоА, для образования которого в ходе гликолиза или β -окисления жирных кислот требуется значительно большее количество реакций. Ацетил-КоА, доставляя атомы углерода в цикл трикарбоновых кислот, является источником субстратов для окислительного фосфорилирования [Северин Е. С., 2009].

3.1.2. Динамика питьевого поведения у крыс

На 20-е сутки эксперимента был выполнен тест предпочтения этанола, в ходе которого оценивались изменения в питьевом поведении крыс, подвергнутых хронической добровольной алкоголизации. Результаты теста представлены на Рисунках 6–8. Как видно из Рисунка 6, в экспериментальной группе отмечалось значительное увеличение объёмов потребляемой жидкости, значительно превосходящее показатели контрольной группы уже на 7-е сутки эксперимента ($p < 0,01$ по отношению к контрольной группе) и выходящее на плато в 14–28 дни эксперимента ($p < 0,001$ по отношению к контрольной группе).

Динамика питьевого поведения

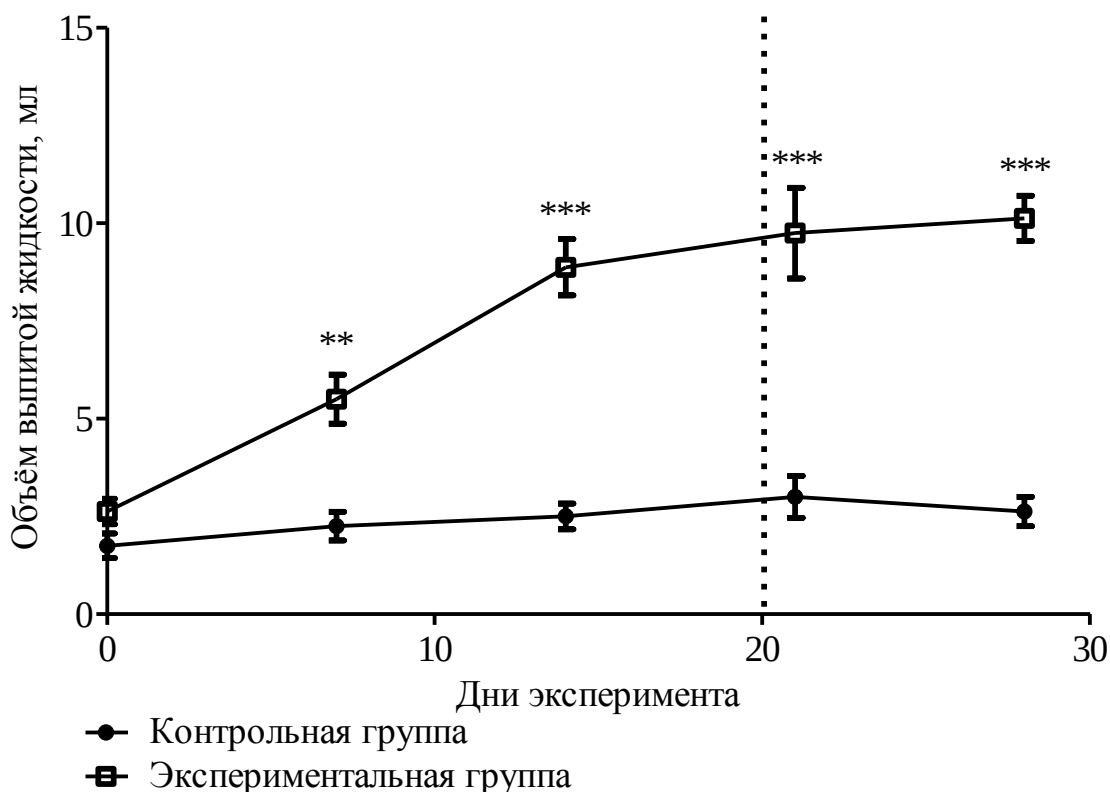


Рисунок 6 – Питьевое поведение у крыс на фоне добровольной хронической 20-дневной алкоголизации.

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

На Рисунке 7 представлены показатели, связанные с развитием полидипсии как симптома алкогольной интоксикации в экспериментальной группе. Признаки полидипсии включали в себя статистически значимое ($p < 0,01$) увеличение потребления воды (в 2,7 раз по сравнению с показателями контрольной группы) и достоверное ($p < 0,05$) повышение количества употребляемого алкоголя (в 5 раз по сравнению с контрольной группой).

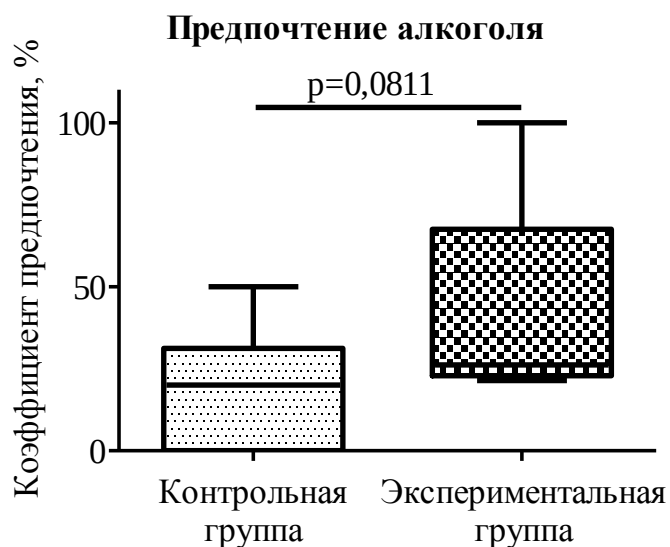


Рисунок 7 – Предпочтение алкоголя у крыс на фоне добровольной хронической 20-дневной алкоголизации.

Примечание: выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни

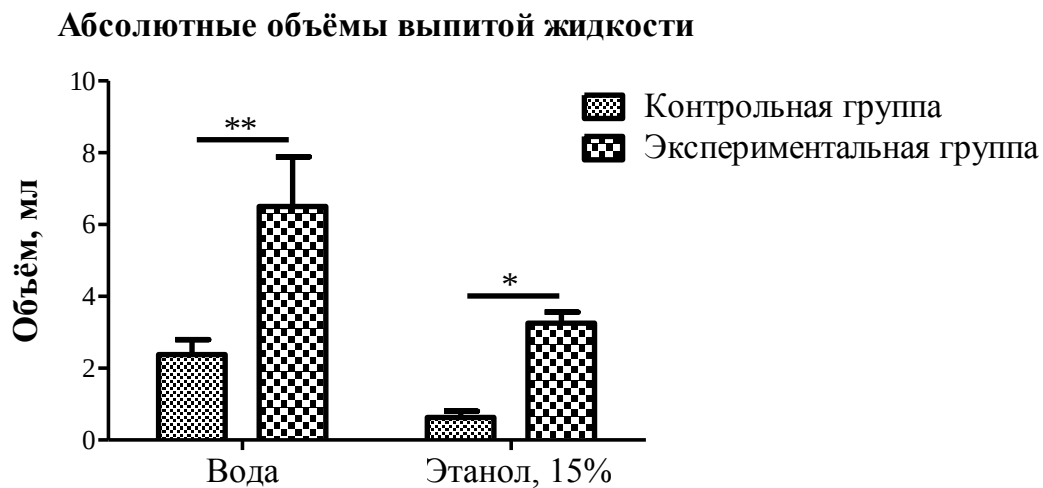


Рисунок 8 – Абсолютный объём выпитой жидкости у крыс на фоне добровольной хронической 20-дневной алкоголизации.

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (сравниваемые группы данных обозначены горизонтальными линиями).

Эти изменения сопровождались тенденцией к увеличению коэффициента предпочтения алкоголя в экспериментальной группе ($p = 0,0811$, Рисунок 8). Описанные явления отражают не только успешное воспроизведение хронической алкогольной интоксикации, но и формирование алкогольной зависимости у крыс в экспериментальной группе.

3.1.3 Изменение неврологического статуса

Неврологические расстройства при хроническом алкоголизме встречаются довольно часто. Они могут появляться уже в начальной стадии заболевания. В последующем они становятся более выраженными и стойкими. Однако психопатологическая симптоматика, как правило, затмевает их. Между тем поражение нервной системы с точки зрения невропатологии имеет большое самостоятельное значение при алкоголизме.

На 20-е сутки эксперимента с целью оценки тяжести неврологической симптоматики была использована шкала тяжести неврологической симптоматики (mNSS). В соответствии с данной шкалой проводили подвешивание животных за хвост (для выявления парезов и параличей), оценивали двигательную активность в домашней клетке (выявление нарушений походки и стереотипных движений) и особенности хождения по горизонтальной балке (оценка координации движений), проверяли сохранность основных рефлексов (стартл-рефлекс, рефлекс наружного слухового прохода, роговичный рефлекс). В экспериментальных группах было обнаружено появление признаков атактической формы неврологического дефицита, проявившейся соскальзыванием и падением животных с горизонтальной балки в течение первых 40 секунд наблюдения. Средний балл, набранный животными экспериментальных групп, статистически значимо превышал показатели контрольных групп на 3,5–4 балла (Рисунок 9), и составлял 5 (3,5–6,25) и 4,5 (3–6) в возрасте 3 и 6 месяцев, соответственно. Показатели, полученные при алкоголизации животных, соответствовали границам легкого и умеренного неврологического дефицита. Достоверных различий между группами, связанных с возрастом животных, выявлено не было.

Результаты проведения оценки тяжести неврологической симптоматики являются объективными критериями эффективности экспериментального воспроизведения модели алкоголизации организма и иллюстрируют поражение периферической нервной системы (алкогольную полиневропатию).

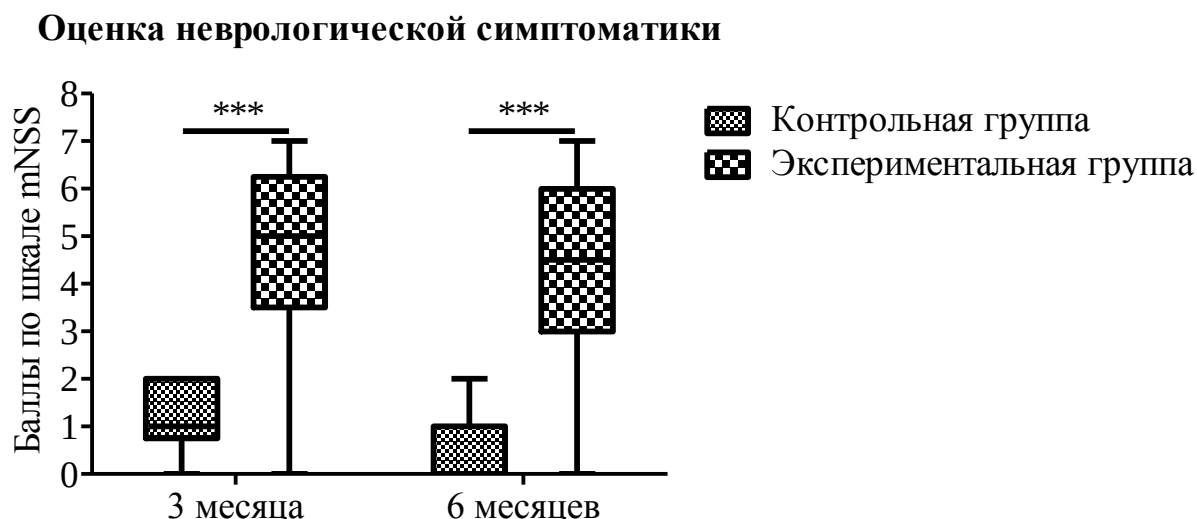


Рисунок 9 – Тяжесть неврологической симптоматики у крыс на фоне добровольной хронической 20-дневной алкоголизации.

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; *** – $p < 0,001$ (сравниваемые группы данных обозначены горизонтальными линиями).

3.1.4 Изменение активности ферментов: АсАТ, АлАТ, ЛДГ в плазме крови крыс

Выход цитоплазматических ферментов в межклеточное пространство, а из него – в периферическую кровь, является одним из признаков висцерального алкоголизма. Этанол прямым путем или опосредованно, после окисления алкогольдегидрогеназой и превращения в ацеталь, способствующий развитию нарушений микроциркуляции, вызывает повреждения клетки, индуцирующие гиперферментемию. Повышение уровня АлАТ и АсАТ на фоне хронической

алкоголизации происходит за счёт токсического воздействия этанола на клетки печени [Виноградова Л. Г. и др., 1990].

В ходе нашей работы было отмечено статистически значимое увеличение активности аминотрансфераз. Статистически значимых различий, связанных с возрастом животных, выявлено не было, несмотря на некоторое снижение активности АсАТ, наблюдавшееся по мере взросления животных: в группе 6-месячных животных была на $20,6 \pm 5,5$ Ед/л ниже, чем в группе 3-месячных животных, а в экспериментальных группах средняя активность АсАТ различалась на $11,3 \pm 8,1$ Ед/л (Рисунок 10). В то же время, алкоголизация приводила к статистически значимому повышению активности АсАТ: в группе 3-месячных животных она увеличилась на $71,4 \pm 10,2$ Ед/л ($p < 0,001$), а в группе 6-месячных – на $91,4 \pm 17,3$ Ед/л ($p < 0,001$) по сравнению с показателями контрольных групп тех же возрастов.

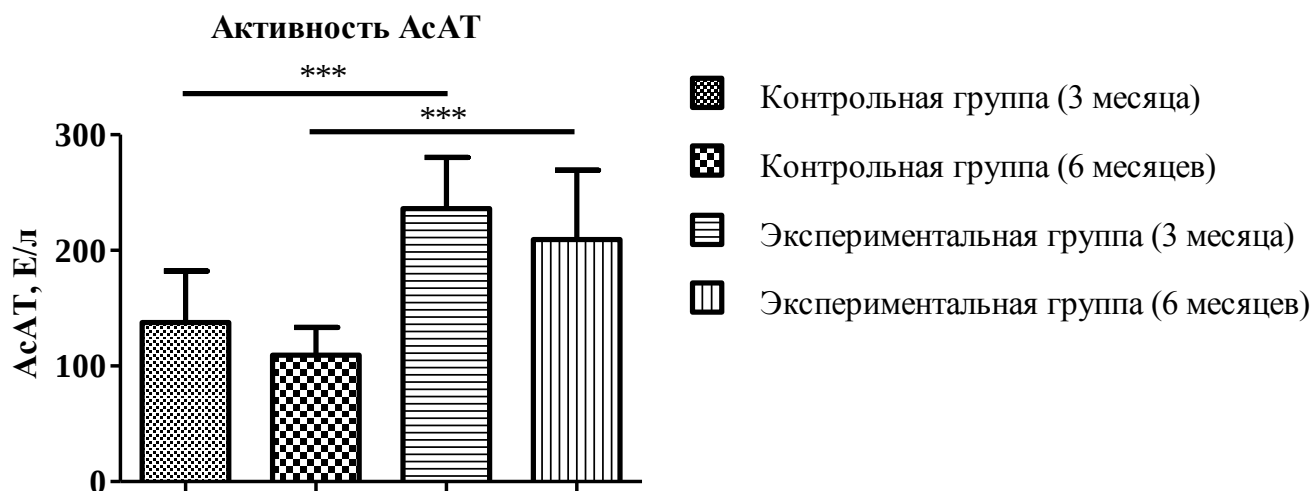


Рисунок 10 – Динамика активности АсАТ у крыс на фоне добровольной хронической алкоголизации.

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; *** – $p < 0,001$ (сравниваемые группы данных обозначены горизонтальными линиями).

Активность АлАТ по мере взросления животных также характеризовалась некоторым снижением (Рисунок 11). В отличие от группы 6-месячных, в группе

3-месячных животных наблюдалось снижение средней активности АлАТ на $22,3 \pm 2,5$ Ед/л. В экспериментальных группах различия носили более выраженный характер, а средняя активность АлАТ в группе 6-месячных животных была на $41,1 \pm 5,7$ Ед/л ниже, чем в группе 3-месячных. На фоне добровольной хронической алкоголизации животных в экспериментальных группах, по сравнению с контрольными, было зарегистрировано достоверное увеличение активности АлАТ: в группе 3-месячных животных – на $130,8 \pm 3,4$ Ед/л ($p < 0,001$), а в группе 6-месячных – на $75,2 \pm 17,1$ Ед/л ($p < 0,001$).

При исследовании активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) было отмечено её значимое ($p < 0,05$, см. Рисунок 12) увеличение у животных экспериментальных групп. В экспериментальной группе 3-месячных животных её активность возросла на $18,2 \pm 4,4$ Ед/л, а в группе 6-месячных – на $11,1 \pm 6,7$ Ед/л соответственно. Различия, связанные с возрастом, носили незначительный характер: в группе 6-месячных животных активность ЛДГ была ниже на $8,9 \pm 6,3$ Ед/л, чем в соответствующей группе 3-месячных животных. Средняя активность ЛДГ в экспериментальных группах различалась на $14,5 \pm 5,2$ Ед/л.

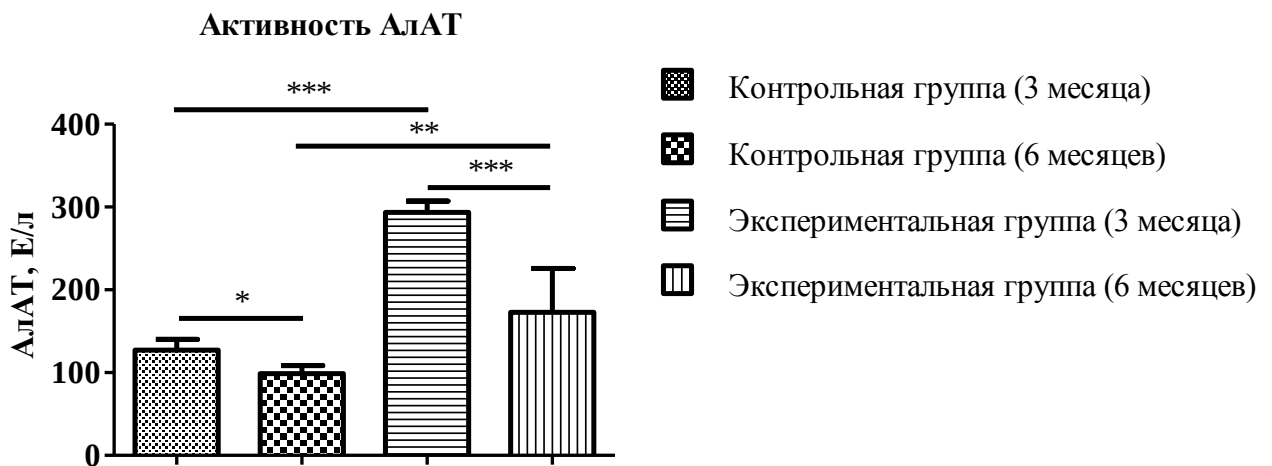


Рисунок 11 – Динамика активности АлАТ у крыс на фоне добровольной хронической алкоголизации.

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (сравниваемые группы данных обозначены горизонтальными линиями).

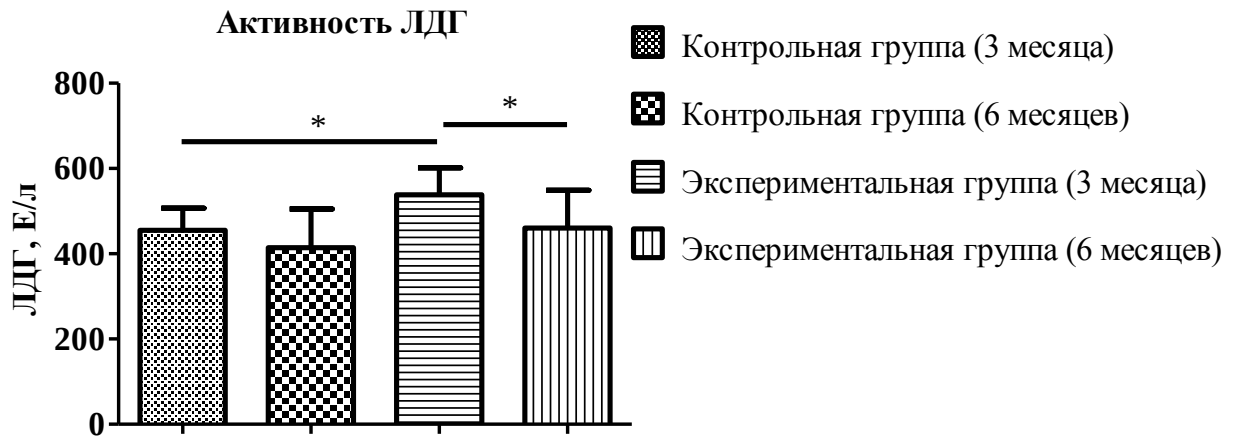


Рисунок 12 – Динамика активности ЛДГ у крыс на фоне добровольной хронической алкоголизации.

Примечание: выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с пост-хок тестом Ньюмена-Кеулса; * – $p < 0,05$ (сравниваемые группы данных обозначены горизонтальными линиями).

Обнаруженные изменения могут быть объяснены тем, что при воспалительных поражениях печени, отмечающихся на фоне хронической алкоголизации, может развиваться гипогликемия. Одной из причин этого является снижение всасывания глюкозы в кишечнике из-за способности алкоголя угнетать транспорт глюкозы вторичным активным транспортом с использованием натрий-зависимого транспортера глюкозы SGLT, расположенного в клетках эпителия желудочно-кишечного тракта. Другой механизм опосредован активацией цАМФ-зависимого каскада экзоцитоза инсулина β -клетками поджелудочной железы. В таких условиях компенсация гипогликемии осуществляется двумя путями: гликогенолизом и глюконеогенезом, происходящими в печени. По мере истощения запасов гликогена, начинает возрастать роль синтеза глюкозы *de novo*, требующего вовлечения гликогенных аминокислот при помощи трансаминаз.

Таким образом, увеличение активности трансаминаз может носить компенсаторный характер, как и увеличение активности ЛДГ, требующееся для

осуществления каталитического превращения лактата в пируват, необходимый для ресинтеза глюкозы.

Таким образом, в ходе исследований, выполненных *in vivo*, обнаружено, что хроническая алкоголизация у крыс вызывает изменения пищевого и питьевого поведения, увеличение предпочтения алкоголя и появление слабой неврологической симптоматики. Изменения в поведении и физическом состоянии животных также сопровождались повышением активности трансаминаз, характеризующиеся переодичностью. Обнаруженные изменения были статистически значимы по сравнению с показателями, полученными у животных контрольных групп.

3.2 ДИНАМИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

3.2.1 Мониторинг микробиоты кишечника во время адаптационного периода

Микробиологическое исследование фекалий крыс, произведённое при получении животных и по окончании карантинного периода, длившегося 14 дней, выявило адаптационную стабилизацию микробиоты, связанную с некоторым изменением условий содержания (Таблица 5). Как видно из представленных данных, достоверных различий состава микробиоты, связанных с возрастом, выявлено не было.

Таблица 5 – Сравнительная динамика микробиоты кишечника во время адаптационного периода, Log_{10} (КОЕ/г), $M \pm m$

Микрофлора кишечника	I возрастная группа, 3 месяца		II возрастная группа, 6 месяцев	
	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

3.2.2 Динамика изменения микробиоты при моделировании хронической алкоголизации

Алкоголь способен существенно изменять количественный и качественный состав микробиоты кишечника. Он приводит к избыточному бактериальному росту в тонкой кишке, что может быть связано с замедлением всасывания глюкозы в данном отделе желудочно-кишечного тракта. Изменения таксономического состава микробиоты у лиц, злоупотребляющих алкоголем, в первую очередь, заключаются в активном росте грамотрицательных бактерий, способных продуцировать ряд токсичных веществ, включающих индол, скатол и фенол, которые приводят к дополнительному вторичному ухудшению всасывания продуктов переваривания. В таких условиях образование ацетальдегида из этанола может ускоряться, что ухудшает барьерную функцию кишечной стенки из-за изменения функциональных свойств белков плотных и адгезивных контактов. При этом в кишечнике отмечаются воспалительные изменения, связанные с увеличением пролиферации эпителиальных клеток и изменением их проницаемости для различных ксенобиотиков, включающих микробные токсины [Bode C., Bode J.Ch., 2003; Yan A. W. et al., 2011; Бакулин И. Г., Шаликиани Н. В., 2016]. Совокупность представленных нарушений функционирования кишечника, в первую очередь, может быть обусловлена наблюдаемыми дисбиотическими изменениями, поэтому раннее их выявление может применяться при диагностике и коррекции более поздних осложнений.

В начале эксперимента в кишечной микробиоте контрольных группы животных преобладали *Bifidobacterium spp.*: в группе 3-месячных животных она составила $5,50 \cdot 10^8 \pm 2,60 \cdot 10^8$ КОЕ/г ($p < 0,05$, Рисунок 15), а в группе 6-месячных – $2,26 \cdot 10^8 \pm 1,94 \cdot 10^8$ КОЕ/г. Также у животных контрольных групп тех же возрастов были выявлены *Lactobacterium spp.*: в группе 3-месячных животных – $7,53 \cdot 10^7 \pm 2,47 \cdot 10^7$ КОЕ/г ($p < 0,05$) и $2,44 \cdot 10^7 \pm 1,90 \cdot 10^7$ КОЕ/г – в группе 6-месячных. У всех животных были обнаружены типичные *E. coli* $2,80 \cdot 10^7 \pm 2,41 \cdot 10^7$ КОЕ/г и $2,44 \cdot 10^7 \pm 1,91 \cdot 10^7$ КОЕ/г, соответственно.

Исследование кишечной микробиоты у животных контрольных групп на 40-сутки эксперимента статистически значимых различий не выявило, несмотря на некоторое снижение количества *Bifidobacterium spp.*: в группе 6-месячных животных $2,44 \cdot 10^8 \pm 1,90 \cdot 10^8$ КОЕ/г ($p > 0,05$), а в группе 3-месячных животных – $2,80 \cdot 10^8 \pm 2,41 \cdot 10^8$ КОЕ/г ($p < 0,05$). Количество *Lactobacterium spp.* по мере взросления животных также характеризовалась некоторым снижением: в группе 3-месячных животных было равно $5,50 \cdot 10^7 \pm 2,59 \cdot 10^7$ КОЕ/г ($p < 0,05$), в группе 6-месячных – $2,62 \cdot 10^7 \pm 1,85 \cdot 10^7$ КОЕ/г, соответственно. В содержании *E. coli* изменений не было выявлено $2,80 \cdot 10^7 \pm 2,41 \cdot 10^7$ КОЕ/г и $2,24 \cdot 10^7 \pm 1,94 \cdot 10^7$ КОЕ/г, соответственно.

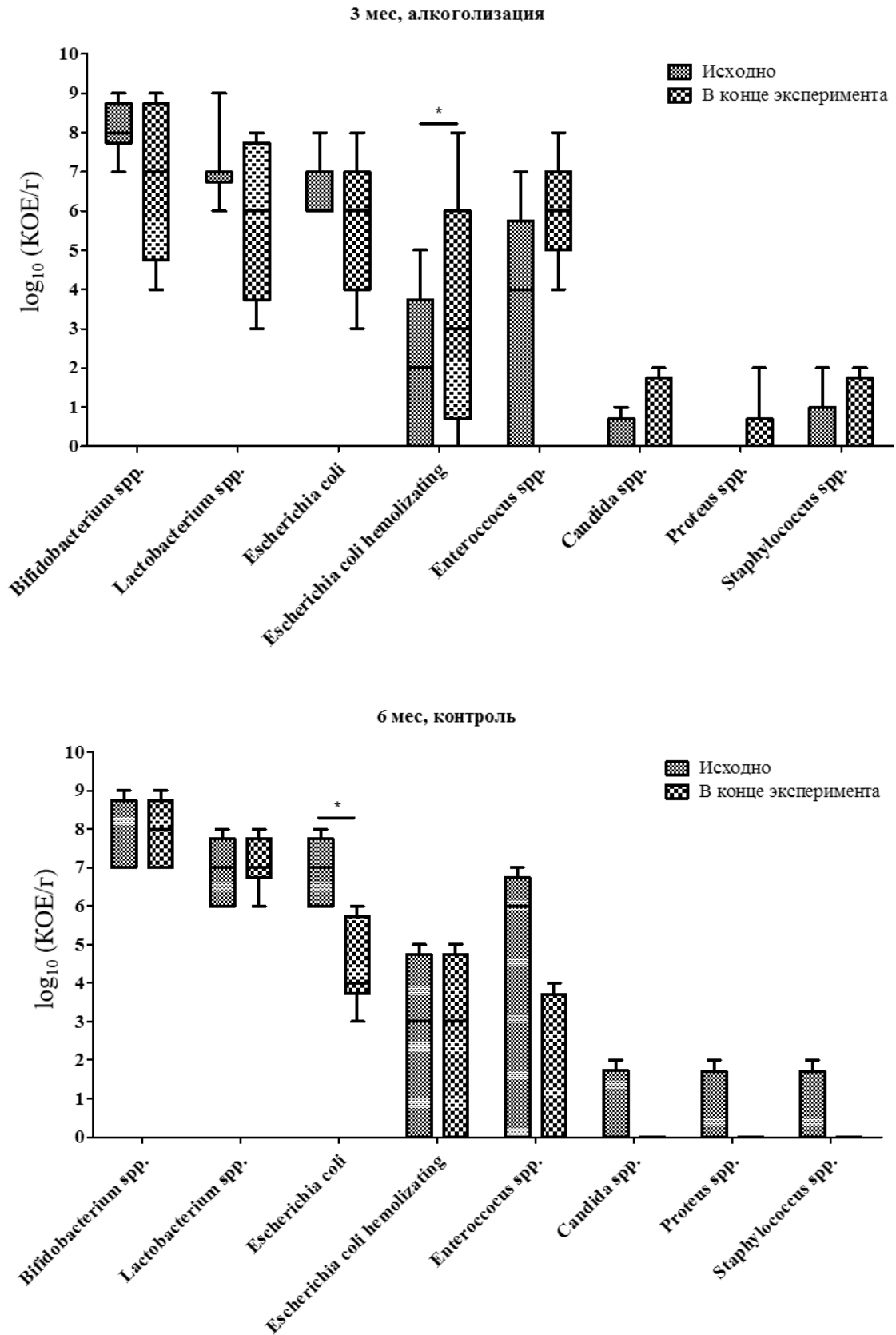


Рисунок 15 – Динамика микробиоты кишечника контрольных групп животных.

Примечание: * – $p < 0,05$

Исследование кишечной микробиоты у крыс, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации, проведенное на 20-е и 40-е сутки эксперимента, выявило дисбиотические нарушения в её составе.

На 20-е сутки в микробиоценозе кишечника наблюдалось сокращение представителей сахаролитических штаммов. *Lactobacterium spp.* выделялись в меньшем количестве в группе 3-месячных животных и составили $1,80 \cdot 10^8 \pm 1,10 \cdot 10^8$ КОЕ/г, а в группе 6-месячных – $3,43 \cdot 10^7 \pm 1,44 \cdot 10^7$ КОЕ/г ($p < 0,01$, см. рисунок 16). У всех крыс было обнаружено незначительное снижение количества *Bifidobacterium spp.*, которое составило $2,80 \cdot 10^8$ КОЕ/г $\pm 1,37 \cdot 10^8$ КОЕ/г – у 3-х месячных и $1,43 \cdot 10^8 \pm 9,63 \cdot 10^8$ КОЕ/г ($p < 0,01$) – у 6-месячных животных соответственно. Среднее количество *E. coli* также немного снизилось: $1,6 \cdot 10^7 \pm 1,06 \cdot 10^7$ КОЕ/г – у 3-х месячных и $1,14 \cdot 10^8 \pm 9,88 \cdot 10^8$ КОЕ/г ($p < 0,001$) – у 6-месячных соответственно.

Кроме того, в кишечной микробиоте крыс обеих возрастных групп были выявлены типичные представители дисбиотических процессов. Также, в экспериментальной группе, по сравнению с контрольной, наблюдалось повышение *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* Так, у 3-месячных крыс выделены *Enterococcus spp.*, количество которых в среднем достигало $1,24 \cdot 10^6 \pm 1,10 \cdot 10^6$ КОЕ/г, а у 6-месячных животных их количество составило $1,23 \cdot 10^6 \pm 9,82 \cdot 10^6$ КОЕ/г. В то же время, экспериментальная алкоголизация привела к появлению в фекалиях *Proteus spp.* и увеличению высеваемости *Candida spp.* Это сопровождалось некоторым увеличением количества *Staphylococcus spp.* в группе 3-х месячных животных, получавших этанол.

На 40-е сутки эксперимента наблюдалось увеличение степени изменения таксономического и функционального состава микробиоты. Количество *Lactobacterium spp.* в группе 3-месячных животных и составили $2,45 \cdot 10^7 \pm 1,43 \cdot 10^7$ КОЕ/г, а в группе 6-месячных – $1,04 \cdot 10^7 \pm 9,98 \cdot 10^6$ КОЕ/г ($p < 0,01$).

Также было обнаружено снижение количества *Bifidobacterium spp.*, которое составило $2,45 \cdot 10^8 \pm 1,43 \cdot 10^8$ КОЕ/г – у 3-х месячных и $1 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^7$ КОЕ/г ($p > 0,01$) – у 6-месячных животных, соответственно. Среднее количество *E. coli* также

снизилось: $1,36 \cdot 10^7 \pm 1,08 \cdot 10^7$ КОЕ/г – у 3-х месячных и $2,15 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$ КОЕ/г – у 6-месячных, соответственно.

Также на 40-е сутки в кишечной микробиоте обеих возрастных групп количество *Enterococcus spp.*, достигало в среднем $1,36 \cdot 10^7 \pm 1,09 \cdot 10^7$ КОЕ/г, а у 6-месячных животных их количество составило $1,13 \cdot 10^7 \pm 9,90 \cdot 10^6$ КОЕ/г. В то же время, наблюдалось статистически значимое повышение *Staphylococcus spp.* и увеличение высеваемости *Candida spp.* и *Proteus spp.*

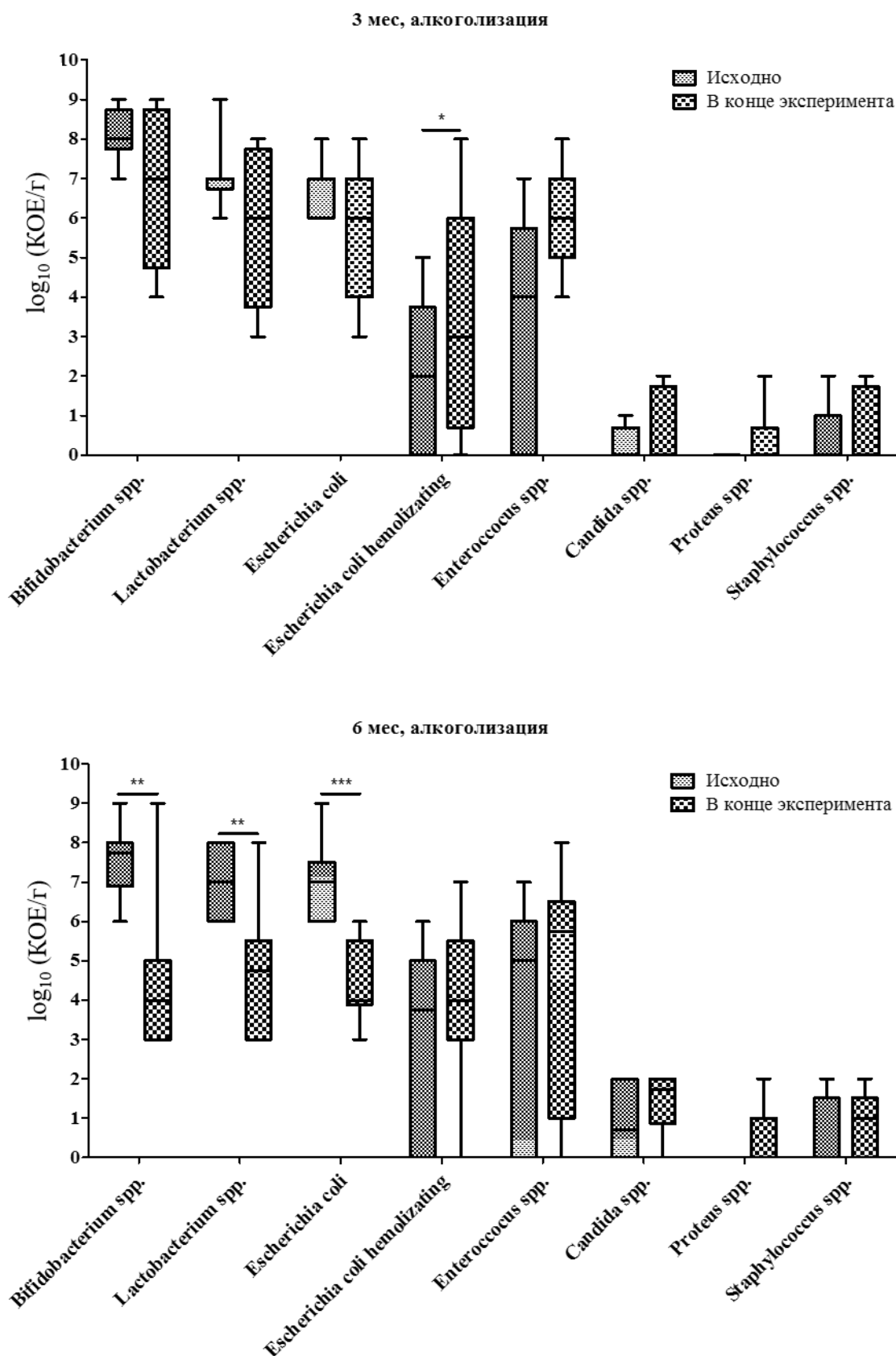


Рисунок 16 – Динамика микробиоты кишечника экспериментальных групп животных. Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

3.2.3 Динамика сахаролитической микрофлоры при моделировании хронической алкогольной интоксикации

Исследование фекалий крыс, подвергнутых моделированию хронической алкоголизации, проведенное на 40-е сутки эксперимента, выявило сокращение сахаролитической микрофлоры – *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2 – 4 порядка (Рисунок 17). Количество *Lactobacterium spp.* статистически значимо снизилось на $6,82 \pm 6,62 \log \text{ КОЕ/г}$ ($p < 0,01$) по сравнению с показателями контрольной группы, где снижение составило $2,35 \pm 1,02 \log \text{ КОЕ/г}$. В то же время, *Bifidobacterium spp.* было выявлено меньше в контрольной группе животных на $2,29 \pm 4,01 \log \text{ КОЕ/г}$ ($p < 0,01$), а в экспериментальной группе на $7,34 \pm 2,58 \log \text{ КОЕ/г}$.

Снижение роста в микробной флоре толстой кишки сахаролитической флоры свидетельствует о негативном влиянии этанола на качественный и количественный состав микрофлоры кишечника.

3.2.4 Динамика протеолитической микрофлоры при моделировании хронической алкогольной интоксикации

При анализе результатов оценки состава протеолитической микрофлоры также был выявлен ряд изменений. В экспериментальных группах, по сравнению с контрольными, наблюдалось достоверное увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов.

В экспериментальной группе по сравнению с показателями контрольной наблюдалось повышение *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* на 3 – 4 порядка (Рисунок 18). Так, *Enterococcus spp.* выделялись на $1,18 \pm 6,81 \log \text{ КОЕ/г}$ ($p < 0,01$), больше в экспериментальной группе, чем в контрольной группе животных. В экспериментальной группе количество *Staphylococcus spp.* также статистически значимо снизилось на $1,17 \pm 7,98 \log \text{ КОЕ/г}$ ($p < 0,01$), по сравнению с показателями контрольной группы.

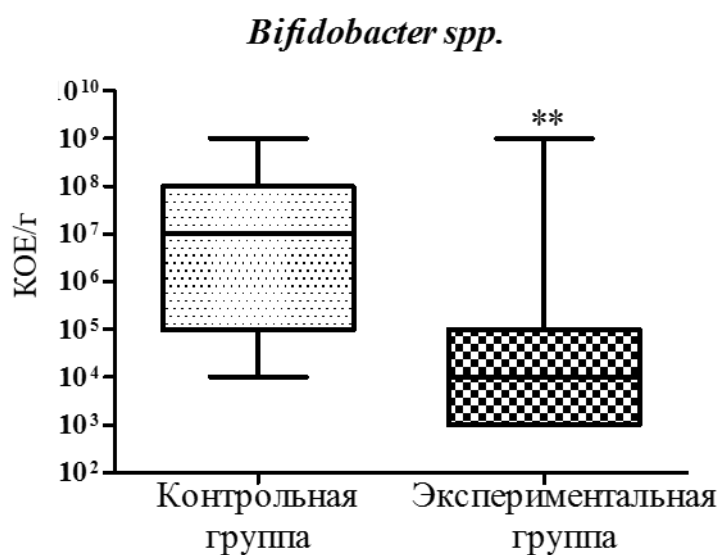
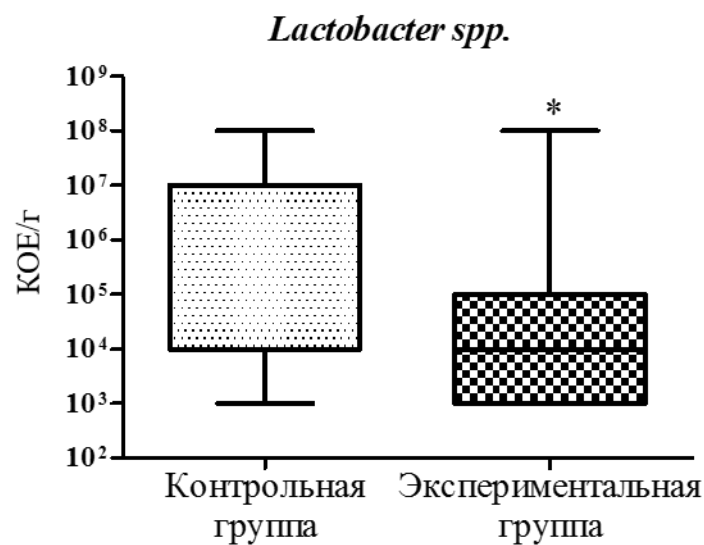


Рисунок 17 – Динамика сахаролитической микробиоты (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*) в фекалиях крыс при моделировании хронической 40-дневной алкоголизации.

Примечание: выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни;

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$



Рисунок 18 – Динамика нормальных представителей протеолитической микробиоты (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*) в фекалиях крыс при моделировании хронической 40-дневной алкоголизации.

Примечание: выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни;

** – $p < 0,01$

Увеличение титра гемолитической *Escherichia coli* отмечалось в экспериментальной группе, где высеваемость данных микроорганизмов составила $5,72 \pm 4,98 \log \text{ КОЕ/г}$, что было статистически значимо выше показателей контрольных групп ($p < 0,01$, Рисунок 19).

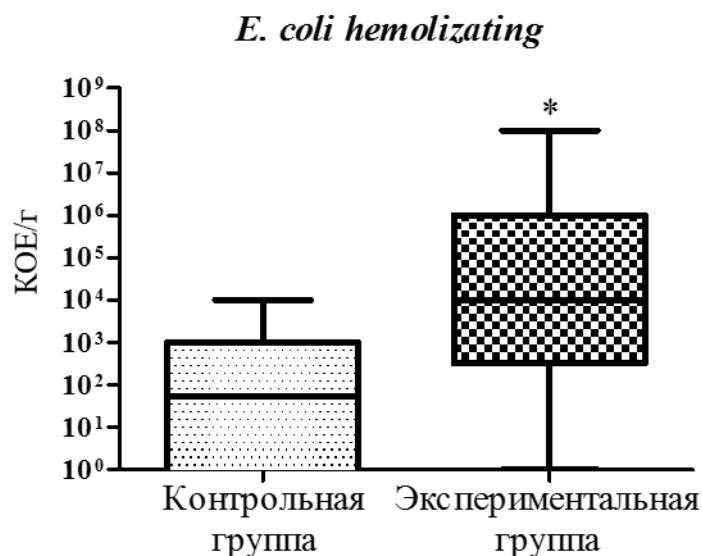


Рисунок 19 – Динамика *E.coli hemolizing* в фекалиях крыс при моделировании хронической 40-дневной алкоголизации.

Примечание: * – $p < 0,05$

У животных экспериментальных групп также отмечалось появление в фекалиях типичных представителей дисбиотических процессов – *Candida spp.* и *Proteus spp.* Были зарегистрированы случаи повышения высеваемости *Candida spp.* на $2,31 \pm 8,86 \log \text{КОЕ/г}$ ($p < 0,01$) в экспериментальных группах (рисунок 20). Количество *Proteus spp.* в экспериментальных группах статистически значимо увеличилось на $10,7 \pm 6,84 \log \text{КОЕ/г}$ ($p < 0,01$).

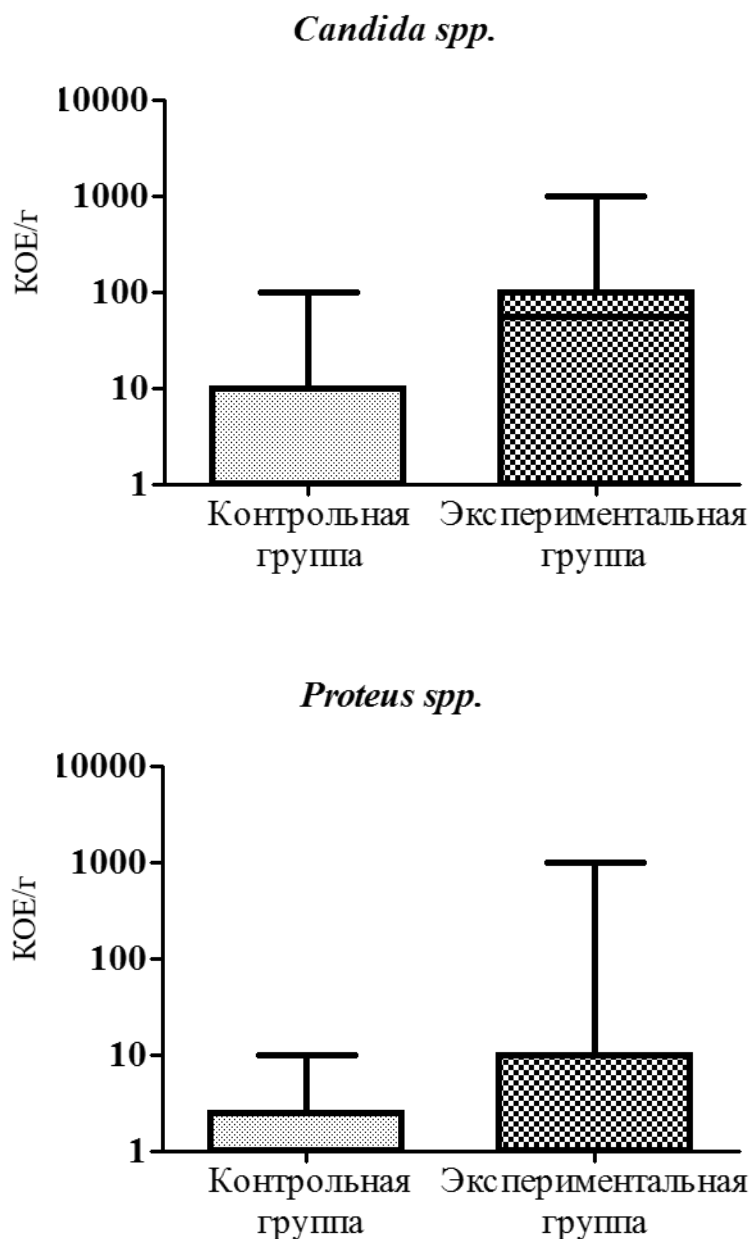


Рисунок 20 – Динамика *Candida spp.* и *Proteus spp.* в фекалиях крыс при моделировании хронической 40-дневной алкоголизации.

Таким образом, в соответствии с полученными результатами, хроническая алкоголизация существенно изменяла состав микробиоты кишечника крыс. Смещение равновесия биоценоза кишечника произошло в сторону патогенной флоры, с увеличением активности аэробов, способных к гемолизу на высоте алкогольобусловленной интоксикации.

3.3 ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-1 β , IL-6 И TNF- α В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС

Клинические и экспериментальные исследования показали, что изменения таксономического состава микрофлоры у лиц с синдромом зависимости от алкоголя (СЗА) заключаются в активном росте грамотрицательных бактерий, которые, в свою очередь, являются источником эндотоксинов, поступающих в кровотоки из кишечника [Bode C., Bode J. C., 2003]. Уровень эндотоксемии коррелирует с уровнем противовоспалительных цитокинов и степенью поражения печени [Malaguarnera M. et al., 2007]. Эндотоксины, наряду с этанолом, приводят к активации как печеночных (клетки Купфера), так и внепеченочных макрофагов и продукции провоспалительных цитокинов – ФНО- α , IL-6, IL-1 β .

При исследовании плазмы крови у крыс, подвергнутых добровольной хронической алкоголизации, на содержания провоспалительных интерлейкинов было зарегистрировано статистически значимое увеличение содержания IL-1 β : у животных экспериментальной группы концентрация IL-1 β в плазме крови достоверно ($p < 0,01$, Рисунок 13) увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с контрольными группами животных и составила 528,8 [431,3; 581,3] пг/мл. Также, эти изменения сопровождались статистически значимым повышением плазменных концентраций IL-6, которая у крыс экспериментальной группы достигала 12,3 [8,9; 15,5] пг/мл ($p < 0,05$), а у животных контрольной группы – 5,3 [4,4; 6,5] пг/мл. В то же время, хроническая алкоголизация приводила к незначительному повышению активности ФНО α (Рисунок 14): в контрольной группе животных она составила 5,2 [4,4; 6,0] пг/мл ($p < 0,05$), а в группе экспериментальных животных – 9,0 [6,5; 11,3] пг/мл ($p < 0,05$). Подобные изменения также могут быть опосредованы совокупностью процессов, названных Н. Вайес (2004) липотоксичностью. Действительно, обнаруженные нами изменения сопровождались некоторым уменьшением массы тела, которое может быть связано с активацией липолиза в адипоцитах. Адипоциты, в свою очередь,

способны к секреции различных цитокинов, в число которых входят ФНО- α и ИЛ-6, усугубляющих воспалительные процессы.

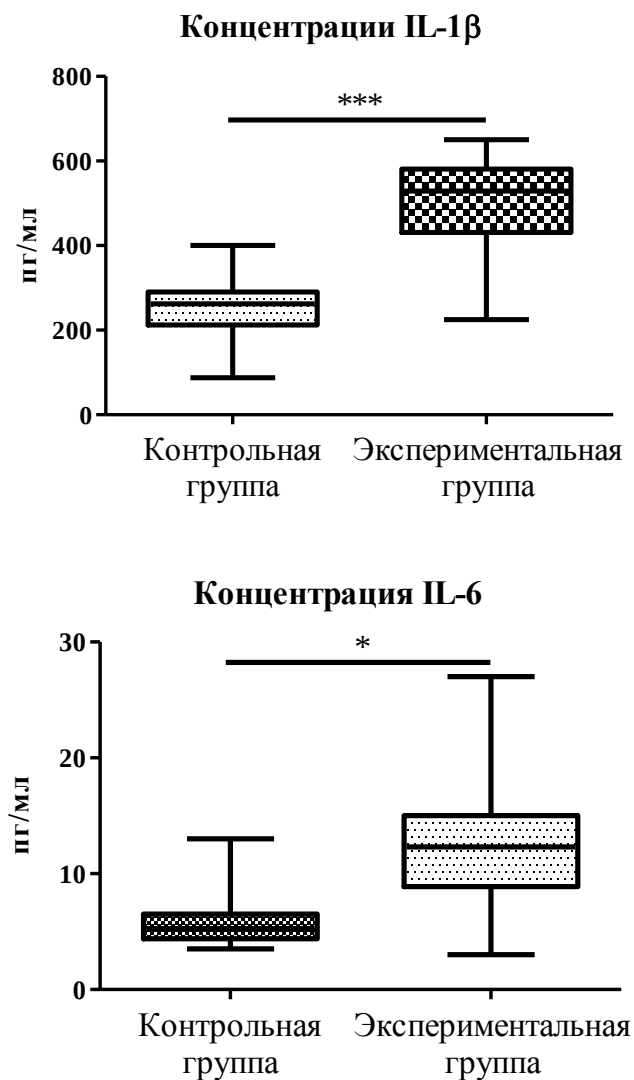


Рисунок 13 – Динамика уровня IL-1 β , IL-6 плазмы крови у крыс на фоне хронической алкоголизации.

Примечание: выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни;

* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

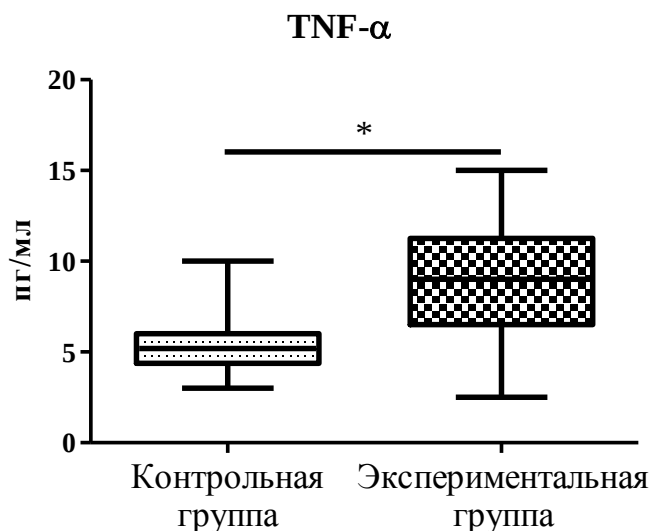


Рисунок 14 – Динамика уровня TNF- α плазмы крови у крыс на фоне хронической алкоголизации.

Примечание: выполнен анализ по U-критерию Манна-Уитни;

* – $p < 0,05$

Полученные в ходе исследования лабораторные изменения вызваны многосторонним влиянием алкоголя и его метаболитов на обмен веществ, а также повреждением внутренних органов. При анализе полученных нами результатов было установлено, что добровольная хроническая алкоголизация приводит к нарушению цитокинового профиля, что говорит об интенсификации воспалительных процессов, сопровождающих эндогенную интоксикацию [Сидельникова В. И. и др., 2015].

Таким образом, проведенное *in vivo* исследование показало, что увеличение количества условно патогенных энтеробактерий, стафилококков, дрожжевых грибов рода *Candida* и *Proteus* при дисбиотических нарушениях кишечника на фоне хронической алкоголизации организма, приводит к провоспалительной реакции, характеризующейся экспрессией генов цитокинов в ответ на проникновение в организм патогенов.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ

Основываясь на полученных в результате эксперимента данных, нами проведена оценка изменения микробиоты кишечника у пациентов, находившихся на лечении в ГБУЗ «Волгоградская областная наркологическая больница», с диагнозом хронического алкоголизма (зависимость от алкоголя) (F10.2.4.1)).

В ходе исследования обнаружено, что в биотопах кишечника у лиц с хроническим алкоголизмом происходят однотипные нарушения в составе микробиоты, связанные с уменьшением содержания облигатных микроорганизмов и повышением количества УПМ.

Анализ видового состава и численности микроорганизмов кишечника у лиц с зависимостью от алкоголя выявил выраженную тенденцию уменьшения количества представителей пробиотических штаммов. Было отмечено достоверное сокращение *Bifidobacterium spp.* до $10^3 - 10^5$ КОЕ/г, по сравнению с нормой – $10^9 - 10^{10}$ КОЕ/г, таким образом, отмечено снижение *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.* в 3–4 и 1–2 раза соответственно. Содержание *Lactobacterium spp.* было также снижено и находилось в пределах $10^2 - 10^3$ КОЕ/г, при норме в $10^7 - 10^8$ КОЕ/г.

При анализе непатогенных штаммов по сравнению с нормой было показано статистически достоверное снижение количества *Escherichia coli spp.* до $10^3 - 10^5$ КОЕ/г при норме $10^6 - 10^8$ КОЕ/г.

Изменения лабильных структур микробного гомеостаза подтверждает характер нарушений среди представителей облигатной микробиоты кишечника, усугублением дефицита сахаролитической микробиоты (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*) и сокращением титра кишечной палочки, что может быть одной из причин функциональных и органических изменений в кишечнике при хронической алкогольной интоксикации.

В ходе выполнения работы нами отмечено увеличение активности аэробов способных к гемолизу (гемолитическая *Escherichia coli* ($10^7 - 10^8$ КОЕ/г)) на

высоте алкогольобусловленной интоксикации, что свидетельствует о наличии воспалительных процессов и является маркером дисбиотических нарушений в кишечнике.

Содержание *Enterococcus spp.* не выходило за пределы нормы и составляло 10^8 КОЕ/г. Достоверных отличий в содержании *Proteus spp.* и *Candida spp.* выявлено не было, они регистрировались у единичных пациентов в количестве 10^3 – 10^5 КОЕ/г.

Обнаружено, что активность АлАТ и АсАТ у данных больных не превышала верхние границы нормы, и составляла $56,4 \pm 3,51$ МЕ и $37,0 \pm 1,33$ МЕ, соответственно, что говорит о слабом воспалительном процессе в печени. В то же время, были отмечены изменения в плазменных концентрациях провоспалительных цитокинов, которые могут трактоваться как результат описанного дисбиоза кишечника. Так, нами было установлено двукратное повышение концентрации IL-1 β , что статистически значимо превышало референсные показатели (5 пг/мл против $11,1 \pm 1,06$ пг/мл, $p < 0,05$). Концентрация IL-6 достигала $6,8 \pm 1,22$ пг/мл, что в 1,5 раза превышало нормальные показатели. Похожие изменения отмечались и в отношении ФНО α , плазменные концентрации которого достигли $10,2 \pm 1,54$ пг/мл, что также превышало референсные значения.

Таким образом, наши клинические наблюдения подтвердили гипотезу, выдвинутую в ходе экспериментальной работы. Интоксикация на фоне хронического алкоголизма вызывала у пациентов существенное снижение *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.* в 3–4 и 1–2 раза соответственно и статистически значимое увеличение концентрации IL-1 β (5 пг/мл против $11,1 \pm 1,06$ пг/мл), что соответствовало сокращению сахаролитической микрофлоры – *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* на 2–4 порядка и повышению продукции провоспалительных цитокинов в плазме крови крыс более чем в 2 раза.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Актуальность проблемы алкогольной зависимости определяется высокой частотой возникновения и повышенной летальностью при данной патологии, что представляет собой серьезнейшую медицинскую и социальную проблему [Кошкина Е. А., Киржанова В. В., 2011; Малахова Ж. Л., 2013; Поплавская О. В. и др., 2015].

Токсическое действие этанола в целом негативно сказывается на функционировании практически всех органов и систем организма. При этом абсолютное большинство тяжелых расстройств здоровья в результате потребления алкоголя обусловлено систематическим избыточным его приемом, которое представляет собой хроническую алкогольную интоксикацию (ХАИ) [Singh A. K. et al., 2007; Сирота Н. А., Чистова Е. А. и др., 2008; Ульянова Л. И. и др., 2011].

Микробиом, в частности – микробиота кишечника – актуальная тема современных биомедицинских исследований. Оригинальные эксперименты на моделях животных показали значение влияния нарушения состава микробиоты кишечника на развитие патогенетических процессов заболевания. За последнее десятилетие, благодаря постоянно развивающимся успехам в методах, позволяющих не только количественно охарактеризовать микробиом кишечника, но и оценить их генотип, экспрессию различных пептидов и продуктов метаболизма, были получены доказательства, подтверждающие связь кишечной микробиоты с широким спектром психоневрологических, иммунологических и аллергических заболеваний [Sekirov, I. et al., 2010; Blaser, M. J., 2014; O'Toole, P. W. & Flemer, B., 2017; Fung, T. C. et al., 2017]. Таким образом, за очень короткий промежуток времени исследования микробиома кишечника оказываются востребованными в диагностике не только заболеваний желудочно-кишечного тракта, но и для ряда метаболических нарушений, вовлекающих различные элементы обмена веществ. При этом значительно переосмыслиется роль

кишечной микробиоты в определении прогноза течения заболевания и в выборе терапевтической тактики [Eamonn M. M. Quigley., 2017].

Определение относительной значимости эффектов взаимодействий патогенетических и патофизиологических факторов, относящихся к микробиоте кишечника, на фоне хронической алкоголизации, хотя и возможно на биологических моделях, все еще труднопроизводимо или вовсе не осуществимо у человека. Таким образом, исследования кишечной микробиоты находятся на стыке лаборатории и клинической практике, где их потенциал в облегчении диагностики, определении прогноза и лечебной тактики вызвал интерес среди исследователей в биомедицинской индустрии [Qin, J. et al., 2010; Arumugam, M. et al., 2011; Zhernakova, A. et al., 2016; Falony, G. et al., 2016].

Разработанная нами, модель хронической алкогольной интоксикации, характеризовалась появлением изменений состояния 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 организма.

Согласно литературным данным, существуют различные механизмы, развития 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 глюкозы в просвете кишечника, в свою очередь, 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 микробиома 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. 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* 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.

Образование ацетальдегида, метаболита этанола, происходит не только под действием алкогольдегидрогеназы, экспрессированной в эпителиоцитах кишечника, но и благодаря некоторым представителям микробиоты кишечника. 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 [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. Обнаруженные изменения могут быть следствием воздействия бактериальных токсинов на функции иммунной системы.

Клетки иммунной системы способны реагировать как на комменсальные бактерии, так и на патогенную микробную флору. Известно, что выделение провоспалительных цитокинов способствует миграции и пролиферации макрофагов в стенке кишечника, что вызывает некоторое снижение проницаемости кишечной стенки для водорастворимых веществ. Этот процесс обуславливает замедление всасывания питательных веществ, которое, в свою очередь, способствует 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 глюкокортикостероидов, 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, которых 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 6) 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

$< 0,05$), *Staphylococcus 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 *Staphylococcus 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.* ($r = -0,508$, $p < 0,05$), *Staphylococcus 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 6 – Корреляционный анализ на высоте алкогольбусловленной 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>Staphylococcus</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>Staphylococcus 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 (Таблица 7). В отношении содержания представителей сахаролитической флоры 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.

Таблица 7 – Корреляционный анализ у лиц с зависимостью от алкоголя (хронический алкоголизм (F10.2.4.1))

	IL-1 β	IL-6	TNF α	<i>Bifidobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Lactobacter</i> <i>spp.</i>	<i>E coli</i>	<i>E.coli</i> <i>hemolizatin</i> <i>g</i>	<i>Enterococc</i> <i>us spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Staphilococc</i> <i>us spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
IL-1 β		0,100	0,900	-0,820*	0,110	-0,800	0,100	-0,200	0,564	0,870*	0,300
IL-6	0,110		-0,100	-0,051	0,109	-0,300	-0,500	-0,200	-0,461	0,115	0,800
TNF α	0,900	-0,100		-0,974*	-0,900	-0,500	0,200	-0,500	0,410	0,900	0,400
<i>Bifidobacter spp.</i>	-0,820*	-0,051	-0,974*		0,820	0,410	-0,153	0,615	-0,263	-0,820	-0,564
<i>Lactobacter spp.</i>	0,111	0,101	-0,900	0,820		0,800	0,118	0,200	-0,564	0,117	-0,300
<i>E coli</i>	-0,800	-0,300	-0,500	0,410	0,800		0,100	0,109	-0,307	-0,800	-0,300
<i>E.coli</i> <i>hemolizing</i>	0,120	-0,500	0,200	-0,153	0,114	0,100		-0,600	-0,359	0,100	-0,100
<i>Enterococcus</i> <i>spp.</i>	-0,200	-0,200	-0,500	0,615	0,200	0,000	-0,600		0,564	-0,200	-0,700
<i>Proteus spp.</i>	0,564	-0,461	0,410	-0,263	-0,564	-0,307	-0,359	0,564		0,564	-0,461
<i>Staphilococcus</i> <i>spp.</i>	0,870*	0,104	0,900	-0,820	0,117	-0,800	0,121	-0,200	0,564		0,300
<i>Candida spp.</i>	0,300	0,800	0,400	-0,564	-0,300	-0,300	-0,100	-0,700	-0,461	0,300	

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

Корреляционный анализ на высоте алкогольобусловленной интоксикации (Рисунок 21) 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 ($p < 0,05$).

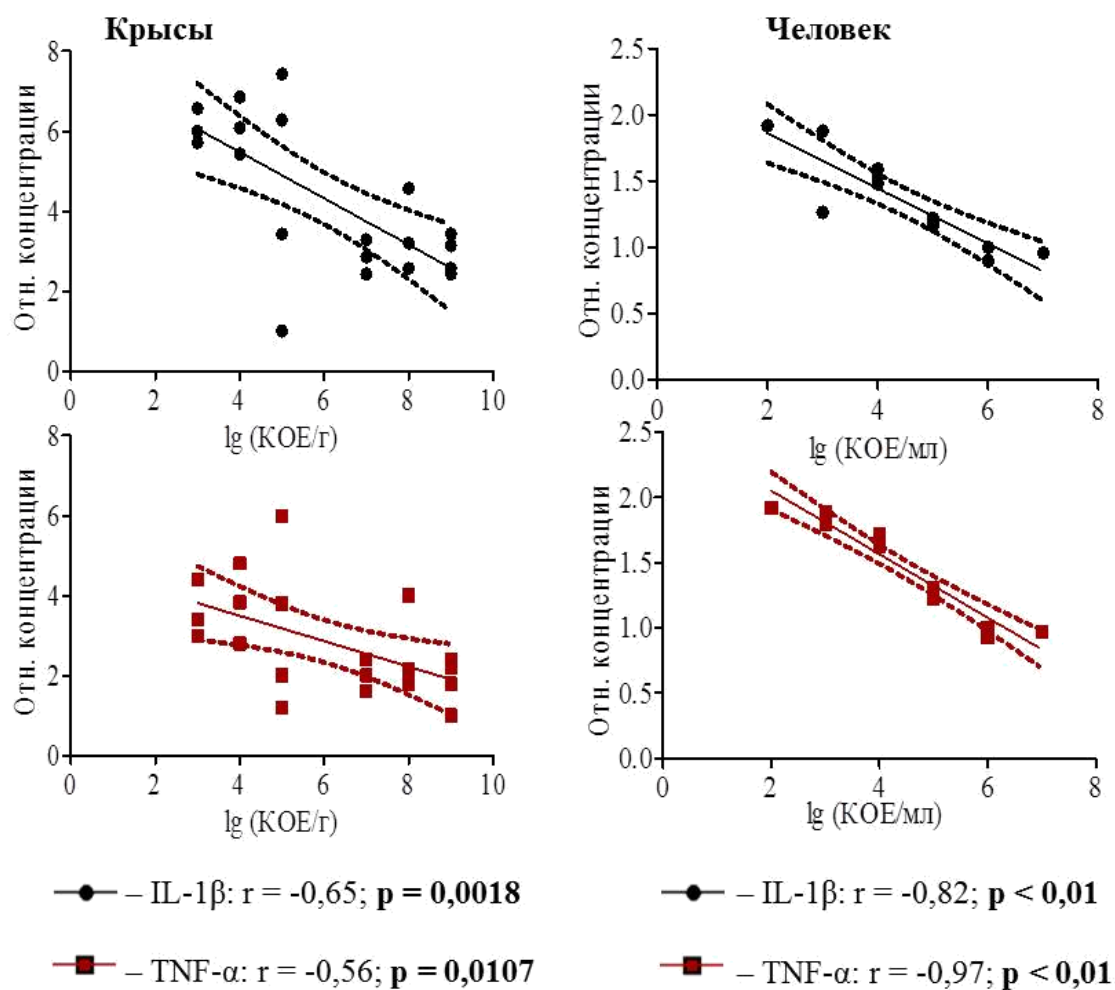


Рисунок 21 – Корреляции между *Bifidobacter spp.* и концентрациями цитокинов IL-1 β и TNF- α у крыс (слева) и человека (справа).

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, клинико-экспериментальные данные, проведенного исследования, демонстрируют изменения в состоянии микробиоты кишечника, что свидетельствует 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 $6,82 \log_{10}$ КОЕ/г, *Bifidobacterium spp.* на $7,34 \log_{10}$ КОЕ/г). Обнаружено, 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). Также изменения таксономического состава микробиоты кишечника при хронической алкоголизации заключается в активном росте типичных представителей дисбиотических процессов, таких как, *Candida spp.* и *Proteus spp.* ($1,2 * 10^2 \log$ КОЕ и $1,1 * 10^2$ – $1,3 * 10^1 \log$ КОЕ соответственно), являющихся источником эндотоксинов.

Эндотоксины, вырабатываемые бактериями в результате изменения колонизационной резистентности кишечника, активизируют печеночные макрофаги и приводят к продукции провоспалительных цитокинов – IL-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 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, характеризующиеся переодичностью 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 микробиоты – *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 микробиоты – *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.* ($1,2 \cdot 10^2 \log$ КОЕ и $1,3 \cdot 10^1$ – $1,1 \cdot 10^2 \log$ 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 клинико-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 клинико-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 зависимостью от алкоголя.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП	–	алкогольная болезнь печени
АЛТ	–	Аланинаминотрансфераза
АСТ	–	Аспартатаминотрансфераза
АФС	–	антифосфолипидный синдром
ДК	–	дисбактериоз кишечника
ЖКТ	–	желудочно-кишечный тракт
ЖСА	–	желточно-солевой агар
КЦЖК	–	короткоцепочечные жирные кислоты
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
ЛПУ	–	лечебно-профилактические учреждения
ЛПС	–	липополисахарид
ПК	–	плотный контакт
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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешукина, А. В. Отношения микроб-хозяин в биотопах толстой кишки при дисбактериозах [Электронный ресурс]: автореф. дис....док-р. мед. наук. – Москва, – 2012.
2. Алешукина, А. В. Изменение профиля провоспалительных цитокинов в кишечнике человека при дисбактериозе на фоне антибиотикотерапии [Текст] / А. В. Алешукина, Э. А. Яговкин, В. М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 6.– С.81-85
3. Альтшулер, В. Б. Алкоголизм [Текст] / В. Б. Альтшулер // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 264.
4. Альтшулер, В. Б. О соотношениях алкоголизма и алкогольных психозов у женщин [Текст] / В. Б. Альтшулер, А. А. Лукин // Наркология. – 2006. – №5. – С. 323
5. Андрушкевич, В. В. Биохимические показатели крови, их референсные значения, причины изменения уровня в сыворотке крови [Текст] / В. В. Андрушкевич // Новосибирск. – 2006. – С. 256
6. Андрющенко, И. В. Табакокурение и наркопотребление как формы аддиктивного поведения студентов-медиков [Текст] / И. В. Андрющенко, Е. В. Малинина // Лечащий врач. – 2011. – № 10. – С. 84–87.
7. Анненкова, А. Б. Роль эндогенной интоксикации в нарушении гомеостаза организма человека при хронических дерматозах [Электронный ресурс]: автореф. дис.... канд. биол. наук. – Нижний Новгород, – 2006.
8. Анохина, И. П. Фундаментальные механизмы зависимости от психоактивных веществ [Текст] / В книге: Наркология Абакумова А. А., Агибалова Т. В., Адамова Т. В., Альтшулер В. Б., Анохина И. П., Арзуманов Ю. Л., Бобков Е. Н., Бурцев А. А., Бузик О. Ж., Бузина Т. С., Васечкин В. Б., Вышинский К. В., Винникова М. А., Гамалея Н. Б., Гуляева Н. В., Должанская Н. А., Дудко Т. Н., Жарков О. Б., Зеренин А. Г., Зенцова Н. И. и др. // Национальное руководство. Москва. – 2016.– С. 96–116.

9. Анохина, И. П. Этиология и патогенез алкоголизма [Текст] / В книге: Алкоголизм Иванец Н. Н., Винникова М. А. Руководство для врачей. Под редакцией: Н. Н. Иванца, М. А. Винниковой. // Москва. – 2011. – С. 65–77
10. Анохина, И. П. Этиология и патогенез наркологических заболеваний: критическая роль генетических факторов [Текст] / А. О. Кибитов, И. П. Анохина // Вопросы наркологии. – 2017. – № 2-3. – С. 42-85.
11. Ардатская, М. Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта // Докт. диссер., М., 300 с., – 2003.
12. Ардатская, М. Д. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция [Текст] / М. Д. Ардатская, С. В. Бельмер, В. П. Добрица, С. М. Захаренко, Л. Б. Лазебник, О. Н. Минушкин, Л. С. Орешко, С. И. Ситкин, Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворов, А. И. Хавкин, Б. А. Шендеров // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 5 (117) – С. 13-50.
13. Арзуматов, Ю. Л. Психофизиологические особенности восприятия у лиц с наследственной отягощенностью алкоголизмом и наркоманией [Текст] / Ю. Л. Арзуматов // Наркология. – 2012. – № 9. – С. 80–87.
14. Асотова, Т. А. Здоровый образ жизни как условие устойчивого развития экономики государства [Текст] / Т. А. Асотова // Вестник Северо-Восточного государственного университета. – 2011. – № 16. – С. 118 – 123
15. Бабаян, Э. А. Ребенок и алкоголь [Текст] / Э. А. Бабаян, М. И. Гонопольский // М.: Весма – Т. – 2001. – С. 168
16. Бакулин, И. Г. Алкоголь и изменения микрофлоры кишечника: современные представления [Текст] / И. Г. Бакулин, Н. В. Шаликиани // Доктор. Ру. Гастроэнтерология. – 2016. – № 1 (118). – С. 38–42.
17. Барановский, А. Ю., Кондрашина Э. А. Дисбактериоз кишечника [Текст] // 3-е издание. – СПб: Питер. – 2008. – 224 с.
18. Бережной, В. В. Микрофлора человека и роль современных пробиотиков в ее регуляции [Текст] / В. В. Бережной, С. А. Крамарев, Е. Е. Шунько, Д. С.

- Янковский, Г. С. Дымент // Здоровье женщины. – 2004. – № 1 (17). – С. 134–139
19. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами: учебник для вузов [Текст] / под ред. Е. С. Северина – 5-е изд., – 2009. – С. 768
 20. Богомолов, Д. В. Социально обусловленные заболевания у жителей современного крупного города [Текст] / Д. В. Богомолов, М. И. Лаптева, А. З. Павлова, А. Л. Павлов // Актуальные вопросы семейной медицины: материалы. Респ. Науч. конф. – Чебоксары. – 2007. – С. 39-43
 21. Бондаренко, В. М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией [Текст] / В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев // Журн. микробиологии – 2004. – № 1. – С. 84–87
 22. Бондаренко, В. М. Методические рекомендации. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника [Текст] / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед // Москва ГУ НИИ - ЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН. – 2007. – С. 48.
 23. Бондаренко, В. М. Микрофлора человека: норма и патология [Текст] / В. М. Бондаренко // Наука в России. – 2007. – №1. – С. 28-35.
 24. Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы [Текст] / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич // М.: Изд-во «ГЕОТАР-медия». – 2007. – С. 304.
 25. Бондаренко, В. М. Роль условно-патогенных бактерий при хронических воспалительных процессах различной локализации. Издательство «Триада». – М., – 2011. – 88 с.
 26. Бондаренко, В. М. Взаимодействие кишечной микрофлоры с Toll-подобными рецепторами в норме и патологии [Текст] / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед // Иммунология. – 2009. – № 5. – С. 317-320.
 27. Бондаренко, В. М. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека [Текст] / В. М. Бондаренко, Е. В. Рябиченко // Эксперим. клин. гастроэнтерол. – 2007. – № 5. – С. 86-92.

- 28.Бонитенко, Ю. Ю. Острые отравления этанолом и его суррогатами [Текст] / Ю. Ю. Бонитенко, Г. А. Ливанов, Е. Ю. Бонитенко и др. – Санкт-Петербург, – 2005.
- 29.Братусь, Б. С. Психология, клиника и профилактика раннего алкоголизма [Текст] / Б. С. Братусь, П. И. Сидоров // М.: Изд-во МГУ. 1984. – С. 144.
- 30.Булатова, Е. М. Кишечная микробиота: современные представления [Текст] / Е. М. Булатова, Н. М. Богданова, Е. А. Лобанова, Т. В. Габруская // Педиатрия. 2009. Т. 87. № 3. С. 104-111.
- 31.Буров, Ю. В. Нейрохимия и фармакология алкоголизма [Текст]. – Москва: М., – 1985. – С. 240.
- 32.Бухарин, О. В. От персистенции к симбиозу микроорганизмов [Текст] / О. В. Бухарин // Журн. микробиол. – 2012. – С. 4-9.
- 33.Возрастная наркология: учебное пособие для студентов высших и средних педагогических, психологических и медицинских учебных заведений [Текст] / Под ред. д.м.н., профессора А. Ю. Егорова. М.: Ин-т общегуманитарных исследований; СПб.: Дидактика Плюс. – 2002.
- 34.Волкова, С. В. Методическое руководство по обеспечению первичной профилактики алкоголизма среди несовершеннолетних [Текст] / С. В. Волкова, Л. И. Бабенко // М. Издательство Твое время. – 2003. – С. 31.
- 35.Воробьев, А. А. Дисбактериозы — актуальная проблема медицины [Текст] / А. А. Воробьев, Н. А. Абрамов, В. М. Бондаренко, Б. А. Шендеров // Вести. РАМН. – 1997. – №3. – С. 4-7.
- 36.Воробьев, А. А. Сравнительное изучение пристеночной микрофлоры толстой кишки в эксперименте на мышах [Текст] / А. А. Воробьев, Ю. В. Несвижский, Е. В. Буданова, А. Е. Зуденков // Журн. микробиологии. – 2001. – № 1. – С. 62–67.
- 37.Высоцкая, Т. В. Алкоголизм в России и его последствия [Текст] / Т. В. Высоцкая, А. А. Левченко // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2017. – Т. 6. – №1. – С. 202.

- 38.Гамалея, Н. Б. Нарушение функций иммунной системы при хронической алкогольной интоксикации [Текст] / Н. Б. Гамалея, Л. И. Ульянова // Алкоголизм. Руководство для врачей. Под ред. Н. Н. Иванца, М. А. Винниковой, Москва. Изд-во МИА. – 2011. – С. 167 – 184.
- 39.Гриневич В. Б. Стеатоз поджелудочной железы. Подходы к терапии [Текст] / В. Б. Гриневич, Е. И. Сас, Ю. А. Кравчук, К. В. Матюшенко // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – № 2-3. – С. 6-9.
- 40.Гоголева, А. В. Аддиктивное поведение и его профилактика [Текст]. — 2-е изд., стер. — М.: Московский психолого-социальный институт; Воронеж: Издательство НПО «МОДЭК». – 2003. – С. 240.
- 41.Горшков, М. К. Молодежь России: социологический портрет [Текст] / М. К. Горшков, Ф.Э. Шереги // М.: Ин-т социологии РАН. – 2010.
- 42.Горшков, М. К. Российское общество в социологическом измерении Социология и общество: пути взаимодействия [Текст] / М. К. Горшков // М.: Вече. – 2010. – С. 45–71.
- 43.Гостева, С. Р. Наркомания и наркотизация, алкоголизм и алкоголизация, табакокурение — угроза здоровью народонаселения Российской Федерации [Текст] / С. Р. Гостева // Исторические, философские, политические и юридические науки, культурология и искусствоведение. Вопросы теории и практики. –2011. – No 2. – С.46 – 53.
- 44.Дей, К. Алкогольная патология печени [Текст] / К. Дей // Наркология. – 2002. – №4. – С. 21–23.
- 45.Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [Текст]. — СПб.: Rus-LASA НП «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными» Рабочая группа по переводам изданию тематической литературы. – 2012. – С. 48.
- 46.Должанская, Н. А. Профилактика риска парентеральных инфекций у лиц, злоупотребляющих алкоголем [Текст] / Н. А. Должанская, Т. С. Бузина // В книге: Алкоголизм Иванец Н. Н., Винникова М. А. Руководство для врачей.

- Под редакцией: Н. Н Иванца, М. А Винниковой. Москва. – 2011. – С. 671 – 695.
- 47.Егоров, А. Ю. Рано начинающийся алкоголизм: современное состояние проблемы [Текст] / А. Ю. Егоров // Вопросы наркологии. – 2002. – № 5. – С. 50 – 54.
 - 48.Ерышев, О. Ф. Алкогольная зависимость: Формирование, течение, терапия [Текст] / О. Ф. Ерышев, Т. Г. Рыбакова [и др.] // СПб. Элби-СПб. – 2002. – С. 193.
 - 49.Заиграев, Г. Г. Алкоголизм и пьянство в России. Пути выхода из кризисной ситуации [Текст] / Г. Г. Заиграев // Социс. – 2009. – № 8.
 - 50.Казанцева, Ю. В. Патогенетические механизмы хронической алкогольной миопатии [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., – 2010.
 - 51.Калинин, А. Г. Современные тенденции и транскультуральные особенности алкоголизации населения европейского севера России и севера Норвегии [Текст]: автореф. дис.... д-ра мед. наук. – СПб. – 2002. – С. 52.
 - 52.Кибитов, А. О. Риск развития острых алкогольных психозов и судорожных припадков: роль семейной отягощённости по алкоголизму [Текст] / А. О. Кибитов, С. А. Шувалов // Наркология. – 2013. – Т. 12. – № 12 (144). – С. 45 – 54.
 - 53.Кирпич, И. А. Систематизация проявлений патогенного влияния алкогольной интоксикации [Текст] / И. А. Кирпич, К. В. Шелыгин // Бюллетень СГМУ. – 2000. – №2. – С.45 – 46.
 - 54.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.
 - 55.Когаладзе, Р. А. Работа с лабораторными животными в контексте биоэтики – история, современность, перспективы [Текст] / Р. А Когаладзе // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 35, № 2. – С. 92 – 109.

56. Костюкевич, О. И. Влияние кишечной микрофлоры на здоровье человека. От патогенеза к современным методам коррекции дисбиоза [Текст] / О. И. Костюкевич // РМЖ. – 2011. – № 5. – С. 304 – 310.
57. Костюкевич, О. И. Роль кишечной микробиоты в развитии заболеваний печени и желчевыводящих путей / О. И. Костюкевич, Н. А. Былова, А. С. Симбирцева // «РМЖ». Гастроэнтерология. – 2016. – № 11. – С. 713-720.
58. Кошкина, Е. А. Алкоголизм. Руководство для врачей: научное издание [Текст] / Е. А. Кошкина, К. В. Вышинский, И. П. Анохина, А. О. Кибитов, Л. Ф. Панченко, Ю. Л. Арзуманов, Н. Б. Гамалея, А. Г. Калинина / Под редакцией Н. Н. Иванца, М. А. Винниковой. – Москва. – 2011.
59. Кошкина, Е. А. Эпидемиология наркологических заболеваний [Текст] / Е. А. Кошкина, В. В. Киржанова. – М. : ГЭОТАР-Медиа. – 2011.
60. Кошкина, Е. А. Медико-социальные и экономические последствия злоупотребления алкоголем в России [Текст] / Е. А. Кошкина, Н. И. Павловская, Р. И. Ягудина [и др.] // Наркология. – 2009. – № 11. – С. 24 – 31.
61. Кошкина, Е. А. Эпидемиология наркологических заболеваний [Текст] / Е. А. Кошкина // В кн.: Руководство по наркологии. Под ред. Н. Н. Иванца. М., Медпрактика. – 2002. – Т. 1. – С. 8 – 32.
62. Кошкина, Е. А. Эпидемиология алкоголизма в России на современном этапе [Текст] / Е. А. Кошкина // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 3. – С. 89 – 91.
63. Кошкина, Е. А. Современное состояние проблемы распространения наркомании и алкоголизма в России [Текст] / Е. А. Кошкина // В сборнике: Федеральный справочник здравоохранения России. Москва. – 2014. – С. 141 – 149.
64. Кошкина, Е. А. Эпидемиология алкоголизма [Текст] / Е. А. Кошкина, В. В. Киржанова, К. В. Вышинский / В книге: Наркология Абакумова А. А., Агибалова Т. В., Адамова Т. В., Альтшулер В. Б., Анохина И. П., Арзуманов Ю. Л., Бобков Е. Н., Бурцев А. А., Бузик О. Ж., Бузина Т. С., Васечкин В. Б., Вышинский К. В., Винникова М. А., Гамалея Н. Б., Гуляева Н. В., Должанская

- Н. А., Дудко Т. Н., Жарков О. Б., Зеренин А. Г., Зенцова Н. И. [и др.] // Национальное руководство. Москва. – 2016. – С. 50 – 62.
65. Крамарь, Л. В. Микробная экология кишечника людей, проживающих в условиях техногенного воздействия крупного промышленного города [Текст]: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., – 2002. – С. 27.
66. Крамарь, Л. В. Современная стратегия коррекции нарушений кишечной микробиоты при дисбактериозе кишечника [Текст] / Л. В. Крамарь, О. Г. Крамарь // Лекарственный вестник. – 2015. – Т. 9. – № 3 (59). – С. 50 – 56.
67. Крамарь, В. С. Микроэкология человека, коррекция дисбактериоза [Текст] / В. С. Крамарь, Т. Н. Савченко, В. О. Крамарь, Л. В. Михайлова, Д. С. Добренёв, А. В. Панченко, К. М. Прокопенко // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 4. – С. 73 – 75.
68. Куркин, Д. В. Изменение скорости мозгового кровообращения у крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий [Текст] / Д. В. Куркин, Е. И. Морковин, Д. В. Верхоляк, Д. А. Бакулин, Е. В. Волотова, И. Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2017. – № 1 (61). – С. 36 – 39.
69. Лелевич, В. В. Способ моделирования прерывистой алкогольной интоксикации у крыс в эксперименте [Текст] / В. В. Лелевич, С. В. Лелевич // Патент на изобретение № 14289 от 01.11.2011
70. Лейхтер, С. Н. Функциональные взаимодействия пищеварительных ферментов и представителей микрофлоры толстой кишки в норме и при остром алкогольном психозе [Текст]: автореф. дис....канд. биол. наук. – Архангельск, – 2010.
71. Лейхтер, С. Н. Влияние дисбиотических нарушений на характер метаболических сдвигов при острой алкогольной интоксикации [Текст] / С. Н. Лейхтер, Н. А. Шидакова, О. В. Лебедева // Бюллетень СГМУ. – 2004. – № 1. – С. 135 – 136.
72. Лейхтер, С. Н. Биохимические и микробиологические проявления алкогольной интоксикации и их коррекция [Текст] / С. Н. Лейхтер, Н. А.

- Шидакова, В. А. Соловьева // Вятский медицинский вестник. – 2007. – № 1. – С. 72 – 73.
73. Лейхтер, С. Н. Нарушение микробиоценоза толстого кишечника при острых алкогольных психозах и его коррекция водорослевыми пробиотическими препаратами [Текст] / С. Н. Лейхтер, О. В. Лебедева // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2005. – № 2. – С. 142 – 144.
74. Лисицын, Ю.П. Алкоголизм: (Медико-социальные аспекты) [Текст] / Ю.П. Лисицын, П.И. Свиридов // Руководство для врачей. – М.: Медицина, – 2009. – С. 527.
75. Личко, А. Е. Подростковая наркология [Текст] / А. Е. Личко, В. С. Битенский // Руководство для врачей. – СПб.: Петр Первый, – 2008. – С. 470.
76. Лужников, Е. А. Федеральные клинические рекомендации по лечению отравлений этанолом [Текст] / Е. А. Лужников, А. В. Сабаев, А. С. Ливанов, Е. Ю. Ботиненко. Москва, – 2013.
77. Людина, А. Ю. Функциональная роль мононенасыщенных жирных кислот в организме человека [Текст] / А. Ю. Людина, Е. Р. Бойко // Успехи физиологических наук. – 2013. – Т. 44. – № 4. – С. 51 – 64.
78. Малахова, Ж. Л. Отношение к алкоголизму потенциальных родителей и перспективы здоровья будущего поколения [Текст] / Ж. Л. Малахова // Современные исследования социальных проблем (электронный научный журнал). – 2013. – № 8 (28). – С. 44.
79. Мартынов, Ю. С. Неврология (учебник) [Текст], Изд. 4-е, Изд-во РУДН, – М. 2006.
80. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Электронный ресурс] : учебник : в 2 т. Т. 1 / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко ; [авт. кол.: В. В. Зверев и др.]. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016 . – С. 448.
81. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Электронный ресурс] : учебник : в 2 т. Т. 2 / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко ; [авт. кол.: В. В. Зверев и др.]. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – С. 480.

82. Методические рекомендации. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника [Текст] / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед, Москва. – 2007. – 200 С.; 12 с. цв. вкл.
83. Микельсаар, М. Э. Формирование и сохранение резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта [Текст] / М. Э. Микельсаар // Лабораторное дело. – 1988. – № 3. – С. 3 – 9.
84. Минаков, С. В. Медико-социальные аспекты и распространенность алкоголизма среди различных групп населения (на примере отдельного муниципального образования) [Текст]: автореф. дис....канд. мед. наук. – Москва, – 2009.
85. Минушкин, О. Н. Подходы к лечению больных синдромом избыточного бактериального роста в тонкой кишке, развившимся в связи с патологией верхних отделов желудочно-кишечного тракта [Электронный ресурс] / О. Н. Минушкин, Л. В. Масловский, Т. Б. Топчий, Ю. С. Скибина, А. Е. Евсиков // Лечащий врач. – 2017. – № 2. – С. 40.
86. Митрохин, С. Д. Дисбактериоз: современные представления. Диагностика. Возможности лечения [Текст] / С. Д. Митрохин // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49. – № 7. – С. 22–33.
87. Морковин, Е. И. Оценка психоневрологического дефицита у грызунов: основные методы [Текст] / Е. И. Морковин, Д. В. Куркин, И. Н. Тюренов // Журнал высшей нервной деятельности. – 2018. – Т. 68. – № 1. – С. 3–15.
88. Можаров, Н. С. Особенности самосознания больных, страдающих алкоголизмом [Текст] / Н. С. Можаров // Неврологический вестник. Журнал им. В.М. Бехтерева. – 2013. – № 4. – С. 81 – 83.
89. Моисеев, В. С. Алкогольная болезнь. Поражение внутренних органов [Текст] / В. С. Моисеев, И. В. Гармаш, П. П. Огурцов, Ж. Д. Кобалаева, А. А. Шелепин. М. : ГЭОТАР-Медиа, – 2014. – 480 с.
90. Навроцкий, Б. А. Социальные, этические и клинические проблемы современной наркологии [Текст] / Б. А. Навроцкий, С. А. Вешнева, О. В. Поплавская // Биоэтика. – 2015. – № 16. – С. 43–47.

91. Неврологические аспекты алкоголизма, Методические разработки по неврологии для студентов лечебного и медико-биологического факультетов [Текст]. Под ред. проф. Л. Г. Ерохиной. - М., 2-й МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова, – 1988. – 36 с.
92. Немцов, А. В. Алкогольная смертность в России. Пути снижения алкогольных потерь [Текст] / А. В. Немцов / Демографические перспективы России и задачи демографической политики: Материалы научно-практической конференции 6–8 апреля 2010 г. // Ред.-сост.: проф. Л. Л. Рыбаковский, проф. А. Е. Иванова. М.: Экон-Информ, – 2010. – С. 66 – 74.
93. Несвижский, Ю. В. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом [Текст] / Ю. В. Несвижский, Е. А. Богданов, В. В. Зверев, А. А. Воробьев // Журн. микробиологии. – 2007. – № 3. – С. 57–60.
94. Нужный, В. П. Методологические аспекты оценки токсичности спиртосодержащих жидкостей и алкогольных напитков [Текст] / В. П. Нужный // Токсикологический вестник. – 1999. – №4. – С. 2-10.
95. Огурцов, П. П. Экспресс-диагностика (скрининг) хронической алкогольной интоксикации у больных соматического профиля: метод. рекомендации № 99/174 (под ред. чл. корр. Рос. акад. мед. наук, профессора В. С. Моисеева) [Текст] / П.П. Огурцов, В.П.Нужный. – М., 2001. – 16 с.
96. Огурцов, П. П. Неотложная алкогольная патология [Текст] / П. П. Огурцов, И. В. Жиров // Пособие для врачей многопрофильного стационара. – СПб.: «Невский Диалект». – 2002. – С. 118, ил.
97. Огурцов, П. П. Биологические факторы риска развития алкогольной зависимости и алкогольного цирроза печени [Текст] / П. П. Огурцов, Т. С. Поликарпова, И. В. Гармаш, О. С. Аришева, А. Е. Гущин, Е. В. Тарасенко, Г. И. Мяндина // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2012. – № 3. – С. 26 – 30.
98. Остапенко, Ю. Н. Федеральные клинические рекомендации «Токсическое действие алкоголя» [Текст]/ Ю. Н. Остапенко, В. А. Маткевич //

- Межрегиональная благотворительная общественная организация «Ассоциация клинических токсикологов». Москва. 2013
99. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава России от 09.06.2003 г. № 2.
 100. Павлов, А. Л. Изменения структур внутренних органов и головного мозга при терминальных состояниях, обусловленных интоксикацией алкоголем и его с уррогатами, судебно-медицинское и клиническое значение [Текст]: автореф. дис....канд. мед. наук. – Москва, – 2014.
 101. Парфенов, А. И. Теоретические вопросы дисбактериоза кишечника [Текст] / А. И. Панфенов, Г. А. Осипов, И. Н. Ручкина // Consilium Medicum. – 2003. – № 6. – С. 328 – 330.
 102. Пауков, В. С. Межорганные отношения при алкогольной интоксикации [Текст] / В. С. Пауков, А. И. Угрюмов, Н. Ю. Беляева // Архив патологии. – 1991. – Т. 53. – №3. – С.3 – 10.
 103. Пермяков, А. В. Патоморфология и танатогенез алкогольной интоксикации [Текст] / А. В. Пермяков, В. И. Витер // Экспертиза. Ижевск. – 2002. – С. 213.
 104. Позднякова, М. Е. Потребление алкоголя в России. Социологический анализ [Текст] / М. Е. Позднякова, Г. Г. Заиграев, Л. Н. Рыбакова, И. И. Шурыгина, В. В. Моисеева, Т. В. Чекинева // М.: Институт социологии РАН, 2011. – С. 102.
 105. Попов, В. Ф. Здоровье и алкоголь [Текст] / В. Ф. Попов, О. Н. Толстихин // Курсовая работа. 2005.
 106. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника (ОСТ 91599.11.0004-2003, утв. Приказом № 231 МЗ РФ от 09.06.2003.
 107. Разводовский, Ю. Е. Алкоголь и смертность от гипертонической болезни [Текст] / Ю. Е. Разводовский // Здравоохранение Российской Федерации. – 2004. – №4 – С. 33-35.
 108. Романов, Д. В. Личностные механизмы формирования наркотической зависимости [Текст] / Д. В. Романов, С. В. Горпиненко // В кн.: Организация межведомственного взаимодействия по профилактике наркомании, лечению,

- реабилитации и трудоустройстве наркозависимых. Опыт самарской области. Самара, – 2001. – С.66-68.
109. Рослый, И. М. Биохимические показатели плазмы крови в оценке метаболических особенностей патогенеза алкоголизма [Текст] / И. М. Рослый, С. В. Абрамов, М. Г. Водолажская, Ю. А. Шуляк // Вестник Ставропольского государственного университета. – 42/2005. – С. 119-128.
 110. Россин, Н. Г. Алкоголизм России [Текст]. Монография. – М.: СтолицаКнига, – 2008. – С. 284.
 111. Руководство по аддиктологии. Под ред. проф. В. Д. Менделевича [Текст]. – СПб.: Речь,– 2007.– С. 768.
 112. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева [Текст]. - М.: Профиль – 2С. – 2010. – С. 358.
 113. Сабаев, А. В., Ливанов А. С., Бонитенко Е. Ю. и др. Федеральные клинические рекомендации «Токсическое действие алкоголя» [Текст]. 2013.
 114. Самарина, Д. А. Жестокость в молодежной среде [Текст] / Д. А. Самарина // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – № 6 (2). – С. 30 – 31.
 115. Сиволап, Ю. П. Алкоголизм и современные методы его лечения [Текст] / Ю. П. Сиволап // Психиатрия и психофармакотерапия. – Т. 11 – №4. – 2009. – С. 19.
 116. Сиволап, Ю. П. К вопросу о рациональном лечении в наркологии [Текст] / Ю. П. Сиволап // Наркология . – 2011. – Т. 10. – № 12. – С.79-81.
 117. Сидельникова, В. И. Эндогенная интоксикация и воспаление: последовательность реакций и информативность маркеров [Текст] / В. И. Сидельникова, А. Е. Черницкий, М. И. Рецкий // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – том 50. – №2. – С. 152-161.
 118. Сизова, Е. Н. Физиологическая характеристика эндогенных модуляторов b-адрено- и М-холинореактивности и их участие в регуляции деятельности

- различных систем организма человека и животных [Текст]: автореф. дис....д-ра биол. наук. – Киров, – 2005.
119. Сирота, Н. А., Чистова Е. А., Суховерхова З. И., Васильченко О. Ю. Профилактика наркомании и алкоголизма в подростково-молодежной среде (Серия: государственная молодежная политика в Российской Федерации) [Текст] / Н. А. Сирота, Е. А. Чистова, З. И. Суховерхова, О. Ю. Васильченко // М.: МЭГ, 2008. – С. 524.
 120. Сирота, Н. А. Профилактика наркомании у подростков: от теории к практике [Текст] / Н. А. Сирота, В. М. Ялтонский, И. И. Хажилина. // М.: Генезис, – 2001. – С. 296.
 121. Сиротинин, И. Н. Эволюция резистентности и реактивности организма [Текст], М., 1981.
 122. Смирнов, В. В. Педагогическая система профилактики и борьбы с вредными привычками (табакокурение, пьянство, наркомания) в России: история и современность [Текст] / В. В. Смирнов // Международный журнал экспериментального образования. – 2010 . – № 10. – С.69-70.
 123. Солдатова, Е. И., Макарычева Г. Г. Алкоголизм как социальная проблема молодёжи [Текст] / Е. И. Солдатова, Г. Г. Макарычева // В сборнике: Научное творчество молодежи как ресурс развития современного общества Сборник статей по материалам региональной научно-практической конференции молодых исследователей. Мининский университет. – 2016. – С. 70-74.
 124. Соловьева, Н. В. Эффективность применения биологически активных добавок с пробиотическим действием у больных с алкогольобусловленными изменениями микробиоценоза толстого отдела кишечника [Текст] / Н. В. Соловьева, Т. А. Бажукова, А. Г Соловьев и др. // Психическое здоровье. – 2009. – № 4. – С. 21–24.
 125. Спектор, Ш. И. Медико-социальные последствия алкоголизма и экономический ущерб обществу от отравлений алкоголем [Текст] / Ш. И. Спектор // Екатеринбург, издательство Урал, ун-та. – 2006. – С. 268.

126. Спектор, Ш. И., Сенцов В. Г., Богданов С. И. Динамика алкогольной патологии в Свердловской области [Текст] / Ш. И. Спектор, В. Г. Сенцов, С. И. Богданов // Проблемы управления здравоохранением. – 2007. – №2. – С. 40-47.
127. Тазуркаев, У. И. Проблема алкоголизма среди подрастающего поколения [Текст] / У. И. Тазуркаев // Молодой ученый. – 2015. – №17. – С. 488-491
128. Тарасов, Ю. А., Лелевич В. В. Эндогенный этанол и ацетальдегид, их биомедицинское значение (обзор литературы) [Текст] / Ю. А. Тарасов, В. В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – N 2. – С. 8-11.
129. Тарасов, А. С., Степанова В. В., Морковин Е. И. Влияние агонистов мелатониновых рецепторов на профиль экскреции 6-сульфатоксимелатонина у крыс, подвергнутых комбинированному стрессу [Текст] / А. С. Тарасов, В. В. Степанова, Е. И. Морковин // Вестник ВолгГМУ. – 2015. – №4 (56). – С. 110-112.
130. Тарасова, О. И., Мазурчик Н. В., Огурцов П. П. Диагностика состояния хронической алкогольной интоксикации. Биологические маркёры злоупотребления алкоголем [Текст]. В книге: Наркология под ред. Абакумова А. А., Агibalова Т. В., Адамова Т. В., Альтшулер В. Б., Анохина И. П., Арзуманов Ю. Л., Бобков Е. Н., Бурцев А. А., Бузик О. Ж., Бузина Т. С., Васечкин В. Б., Вышинский К. В., Винникова М. А., Гамалея Н. Б., Гуляева Н. В., Должанская Н. А., Дудко Т. Н., Жарков О. Б., Зеренин А. Г., Зенцова Н. И. и др. Национальное руководство. – Москва. – 2016. – С. 856-861.
131. Топчий, Т. Б. Синдром избыточного бактериального роста в клинической практике [Текст] / Т. Б. Топчий, О. Н. Минушкин, Ю. С. Скибина, А. Е. Евсиков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 3 (139). – С. 71-78.
132. Траянова, Т. Г., Николаев А. Ю., Виноградова Л. Г., Жарков О. Б., Лукомская М. И., Моисеев В. С. Алкогольная болезнь: Поражения внутренних органов при алкоголизме [Текст]. Под ред. В. С. Моисеева: Учеб. пособие. – М.: Изд-во УДН, – 1990. – С. 129.

133. Ульянова, Л. И. Нарушение функции иммунной системы при острой алкогольной интоксикации и алкоголизме [Текст]: автореф. дис..... д-ра биол. наук. – М., – 2013. – С. 214.
134. Успенский, Ю. П. Тревожные расстройства и их коррекция в гастроэнтерологической практике [Текст] / Ю. П. Успенский, Е. В. Балукова // Consilium-Medicum. – 2008. – № 2. Общие вопросы гастроэнтерологии.
135. Успенский, Ю. П. Влияние употребления алкоголя на состояние кишечного микробиоценоза у пациентов с хроническим гастродуоденитом [Текст] / Ю. П. Успенский, М. А. Шевяков, Н. В. Барышников // Человек, алкоголь, курение и пищевые аддикции : сб. материалов II Междисциплинар. науч. конгр. – СПб., 2008. – С. 186.
136. Федина, Р. Г. Исследование гипофизарно-тиреоидно-надпочечниковой системы и биохимических характеристик у юношей, курящих и употребляющих алкоголь [Текст] / Р. Г. Федина, Л. А. Дубковская, А. Н. Патрушев // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 184-185.
137. Федорова, Е. Р. Микрофлора организма человека и способы ее забора. Для микробиологических исследований. Учебно-методическое пособие для студентов лечебного и педиатрического факультетов [Текст] / Е. Р. Федорова, Ю. В. Валеева // Казань. – 2013. 61 с.
138. Хайтов, Р. М., Пинегин Б. В. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования. Иммунология. – 1997. – 5. – С. 4-7.
139. Чухрова, М. Г. Микробиоценоз кишечника и его роль при алкоголизме [Текст] / М. Г. Чухрова, Н. Г. Перминова, И. В. Тимофеева // Человек и алкоголь – 2007: сб. материалов I Междисциплинар. науч. конгр. – СПб., – 2007. – С. 121.
140. Шекунова, Е. В. Моделирование алкогольной зависимости у животных [Текст] / Е. В. Шекунова, В. А. Кашкин, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – № 3. – С. 84-91.

141. Шелыгин, К. В. Профилактика наркоманий и алкоголизма : учеб.-метод. рекомендации [Текст] / К. В. Шелыгин, Н. А. Червина; ред. П. И. Сидоров ; Сев. гос. мед. ун-т. Фак. клин. психологии. – Архангельск : Сев. гос. мед. ун-т. – 2004. – С. 61-62.
142. Шелыгин, К. В. Использование лабораторных животных в токсикологическом эксперименте: метод. рекомендации [Текст] / К. В. Шелыгин, И. А. Кирпич, В. Я. Леонтьев ; под ред. П. И. Сидорова // Сев. науч. центр Сев.-Зап. отд-ния РАМН, Сев. гос. мед. ун-т. – Архангельск : Издат. центр СГМУ. – 2002. – С. 19-20.
143. Шендеров, Б. А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека [Текст] / Б. А. Шендеров // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – № 1. – С. 61–66
144. Шендеров, Б. А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома [Текст]. М.: ДеЛи Принт, 2008. С. 319
145. Шереги, Ф. Э. Девиации подростков и молодежи: алкоголизация, наркотизация, проституция [Текст] / Ф. Э. Шереги. - М.: Центр социологических исследований, – 2001. – С. 348.
146. Шереги, Ф. Э., Арефьев А. Л., Вострокнутов Н. В., Зайцев С. Б., Никифоров Б. А. Девиация подростков и молодежи: алкоголизация, наркотизация, проституция [Текст]. М. – 2001. – С. 48.
147. Щепин, О. П. Проблемы здоровья населения Российской Федерации и ее прогноз до 2005 г. [Текст] / О. П. Щепин // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2001. – № 3. – С. 3-9.
148. Шумилов, П. В. Нерешенные вопросы патогенеза воспалительных заболеваний кишечника у детей. Роль пристеночной микрофлоры кишечника [Текст] / П. В. Шумилов // Педиатрическая фармакология. – 2010. – Т. 7. – №5. С. 54-58.

149. Яковлев, М. Ю. Роль кишечной микрофлоры и недостаточности барьерной функции печени в развитии эндотоксинемии и воспаления [Текст] / М. Ю. Яковлев // Казанский мед.журн. – 1988. – № 5. – С. 353-358.
150. Яковлева, А. В., Софронов Р. П. Профилактика алкоголизма, табакокурения и наркомании: Дополнительный материал для учителей [Текст] / А. В. Яковлева, Р. П. Софронов // Якутск: изд-во ЯГУ, – 2009. – С. 124.
151. Яковлева, Т. В. Проблемы формирования здорового образа жизни у детей и учащейся молодежи [Текст] / Т. В. Яковлева, А. А. Иванова, Р. Н. Терлецкая // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. 93, № 5. – С.792-795.
152. Янковский, Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления [Текст]. – К.: Эксперт ЛТД, – 2005. – С. 362.
153. Arumugam, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature. – 2011. – 473. – P. 174–180.
154. Balzan S., Quandros C.A., Cleve R.D. et al. Bacterial translocation: Overview of mechanism and clinical impact. // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007, 22(4):464-471.
155. Baraona E., Julkunen R., Tannenbaum L., Lieber C. S. Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats // Gastroenterology. – 1986. – Vol. 90 (1). – P. 103–110.
156. Basuroy S., Sheth P., Mansbach C. M., Rao R. K. Acetaldehyde disrupts tight junctions and adherens junctions in human colonic mucosa: protection by EGF and L-glutamine // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2005. – Vol. 289. (2). – P. 367–375.
157. Berg, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract.// Trends Microbiol. – 1995, Vol. 3, P. 149-54.
158. Bode C., Bode J. C. Effect of alcohol consumption on the gut // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 17 (4). – P. 575–592.
159. Bode C., Koley R., Schäfer K., Bode J. C. Breath hydrogen excretion in patients with alcoholic liver disease – evidence of small intestinal bacterial overgrowth // Z. Gastroenterol. – 1993. – Vol. 31 (1). – P. 3–7

160. Bode Ch., Schäfer C., Bode J. Ch. The role of gut-derived bacterial toxins (endotoxin) for the development of alcoholic liver disease in man // *Gut and the Liver*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, – 1998. – P. 281-298
161. Blaser, M. J. The microbiome revolution // *J. Clin. Invest.* – 2014. – 124. – P. 4162–4165.
162. Chen J., Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral Deficits After Stroke in Rats / J. Chen, P.R. Sanberg, Y. Li et al. // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32. – P. 2682-2688.
163. Chen Y., Yang F., Lu H., Wang B. et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 54 (2). – P. 562–572.
164. Chen J., Sanberg P. R., Li Y., Wang L. et al. Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral Deficits After Stroke in Rats // *Stroke*. – 2001. – Vol. 32. – P. 2682-2688.
165. Clausen, M. R., Mortensen P. B. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colits. // *Gut*. – 1995. – V. 37. – P. 684-689.
166. Dyr W. Struktura spożywania alkoholu w modelach zwierzęcych // *Alkoholizm i Narkomania*. – 2004. – Vol. 17. – N 1-4. – P. 151-157.
167. Drewnowski, A., Rolls, B. J. Obesity treatment and prevention: new directions // *Ann Nutr Metab*. – 2012. – V. 61(4). – P. 271-362.
168. Elmer G. W., Farland L. W., Surawicz C. M. Biotherapeutic Agents and Infection Diseases // *Human Press*. – 1999. – P. 316.
169. Ergerer G., Stikel F., Seitz H.K. Alcohol and the gastrointestinal tract // Preedy V.R., Watson R.R. (eds): *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*. – London, Taylor & Francis, 2005. – Vol. 2. – P. 559-572
170. Falony, G. et al. Population-level analysis of gut microbiome variation // *Science*. – 2016. – 352. – P. 560–564.

171. Fung, T. C., Olson, C. A., Hsiao, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease // *Nat. Neurosci.* – 2017. – 20. – P. 145–155.
172. Gibson, G. R., Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // *J. Nutr.* – 1995. – Vol. 125. – P. 1401-1412.
173. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137 (1 Suppl). – P. 259–266.
174. Gut microflora. Digestive physiology and pathology. Edited by J.-C. Rambaud, J.-P. Buts, G. Corthier, B. Flourie. London. John Libbey. Evrotext. – 2006. – 247 p.
175. Hauge T., Persson J., Danielsson D. Mucosal bacterial growth in the upper gastrointestinal tract in alcoholics (heavy drinkers) // *Digestion.* – 1997. – Vol. 58. – 6. – P. 591–595.
176. Heilig M., Koob G.F. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol ependence // *Trends Neurosci.* – 2007. – 30. – P. 399-406.
177. Hentges, D. J. Human intestinal microflora in health and disease // New York: Academic Press, – 1983.
178. Hoek J. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury / J. Hoek, J. Pastorino // *Alcohol.* – 2002. – Vol. 1, N 27. – C. 63–68.
179. Isolauri E, Kalliomaki M, Laitinen K, Salminen S. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease // *Curr. Pharm. Des.* – 2008. – 14. – P. 1368–1375
180. Koob G. F. The neurobiology of addiction: A neuroadaptational view relevant for diagnosis // *Addiction.* – 2006. – 101, Suppl. 1. – P. 23–30.
181. Koppes L. L. J., Twisk J. W. R., Snel J., De Vente W., Kemper H. C. G. Personality Characteristics and Alcohol Consumption; Longitudinal analyses in 13 to 33-year-old men and women // *Journal of studies on Alcohol.* – 2001. – 62. – P 494-500.
182. Ley R. E., Hamady M., Lozupone C. et al. Evolution of mammals and their gut microbes // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – P. 1647–1651.

183. Leifman H. Trends in population drinking // Alcohol in postwar Europe / T. Norstrom ed Stockholm. – 2002. – P. 49-82.
184. Lester D., Freed E. X. Criteria for an animal model of alcoholism // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1973. – 1103. – P.107.
185. Loguercio C., Federico A., Tuccillo C., Terracciano F. et al. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases // J. Clin. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 39. – 6. – P. 540-543.
186. MacDonald T. T., Carter P. B. Requirement for a bacterial flora before mice generate cells capable of mediating the delayed hypersensitivity reaction to sheep red blood cells // J. Immunol. – 1979. – 122. – P. 2624-2629.
187. MacGregor R. R. Alcohol and immune defense // JAMA. – 1986. – 256. – P. 1474-1479.
188. Malaguarnera M., Greco F., Barone G., Gargante M. P. et al. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study // Dig. Dis. Sci. – 2007. – Vol. 52. – 11. – P. 3259–3265.
189. Montiel-Castro A. J. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality / Montiel-Castro A. J., González-Cervantes R. M., Bravo-Ruiseco G., Pacheco-López G. // Front. Integr. Neurosci. – 2013. – Vol. 7. – P. 70.
190. O'Hara, A. M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO reports. – 2006, 7: 688-693.
191. O'Toole, P. W., Flemer, B. From culture to highthroughput sequencing and beyond: a layperson's guide to the "omics" and diagnostic potential of the microbiome // Gastroenterol. Clin. North Am. – 2017. – 46. – P. 9–17.
192. Qin, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing // Nature. – 2010. – 464. – P. 59-65.
193. Rolfe R. D. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host // Rev. Infect. Dis.– 1984.–Vol.6.– Suppl 1. – S73-9.
194. Samuel B. S., Shaito A., Motoike T. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled

- receptor, Gpr41 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105. – 43. – P. 16767-16772.
195. Sansonetti P. War and peace at mucosal surfaces. *Immunology.* – 2004. – 4. – P. 953-964.
 196. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease // *Physiol. Rev.* – 2010. – 90. – P. 859–904.
 197. Spanagel R., Holter S. M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism // *J. Neural. Transm.* – 2000. – 107(6). – P. 669-680.
 198. Tabakoff B., Hoffman P. L. Animal models in alcohol research // *Alcohol. Res. Health.* – 2000. – 24. – P. 77-84.
 199. Tannock, G. W. Normal microflora // London: Chapman & Hall, – 1995.
 200. Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M. et al. The human microbiome project // *Nature.* – 2007. – Vol. 449 (7164). – P. 804–810.
 201. Unanue, E. R. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in stages of *Listeria resistans*. // *Curr.Opin.Immunol.*-1997.-Vol.9(1).-P.35-43
 202. Verda E. F., Collins S. M. Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2004. – 18 (2). – P. 271-285.
 203. Virmani M., Majchrowicz E., Swenberg C. E., Gangola P., Pant H. C. Alteration in calcium-binding activity in synaptosomal membranes from rat brains in association with physical dependence upon ethanol // *Brain Res.* – 1985. – 359 (1-2). – P. 371-374.
 204. Vollard E. J., Clasener H. et al. Influence of amoxycillin erythromycin and roxitromycin on colonization resistance and appearance of secondary colonization in healthy volunteers // *J. Antimicrob. Chemotherapy.* – 1987. – 13. – P. 131–138
 205. Waaij D. Colonization pattern of the digestive tract by potentially pathogenic microorganisms: Colonization controlling mechanisms and consequences for antibiotic treatment // *Infection.* — 1983. – 11. – P. 90–92.

206. Whishaw I. Q. The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests / edited by Ian Q. Whishaw, Bryan Kolb // Oxford University Press. – 2005.
207. Yan A. W., Fouts D. E., Brandl J., Stärkel P. et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease // Hepatology. – 2011. – Vol. 53. – 1. – P. 96–105.
208. Zabolotskikh I. B., Golubtsov V. V. Development of multiple organ dysfunction in sepsis // Anesteziol. Reanimatol. – 2006. – 6. – P. 20-23.
209. Zhernakova A. et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity // Science. – 2016. – 352. – P. 565–569.
210. Zima T., Kalousova Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2005. – Vol. 11. – 29. – P. 110–115.