

На правах рукописи

МУХИНА Александра Юрьевна

**ВЗАИМОСВЯЗЬ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ И ФУНКЦИЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И
ПРИМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ТАФТЦИНА У КРЫС**

03.02.03 – микробиология, 14.03.03. – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Минздрава России

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Бобынцев Игорь Иванович

доктор биологических наук, доцент

Медведева Ольга Анатольевна

Официальные оппоненты:

Воронина Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» лаборатория психофармакологии, заведующая лабораторией;

Червинец Вячеслав Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «15» сентября 2020 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.08 при ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.м.н., профессор



Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Современные представления о бинаправленной коммуникации между нервной системой и кишечной микробиотой нашли отражение в понятии «кишечно-мозговая ось», которая координирует физиологические функции и метаболические реакции посредством автономной нервной системы, гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, а также молекул «микробной сигнализации» (Ивашкин В.Т. и др., 2017; Bravo J.A. et al., 2012; Hansen M.B. et al., 2003; Mayer E.A., 2011; Stilling R.M. et al., 2014).

Стресс способен активировать кишечно-мозговую ось с помощью гормональных и нейронных путей, что влечет за собой нарушение барьерной функции кишечника и aberrации в составе микробиоценоза толстой кишки (Bailey M. T. et al., 2011; Gareau M. G. et al., 2008; Lloyd-Price J. et al., 2016). Установлено, что изменения качественного и количественного состава кишечной микробиоты, в свою очередь, влияют на стресс-реакцию, когнитивные способности, тревожность, продукцию нейротрофических факторов (Fung T. C. et al., 2017).

Поэтому представляется перспективным разработка патогенетически обоснованных способов коррекции сдвигов в составе кишечного микробиоценоза с использованием препаратов, оказывающих стресс-лимитирующее действие. До настоящего времени наиболее распространенными средствами лечения тревожных и стресс-ассоциированных расстройств остаются бензодиазепины, применение которых сопровождается развитием ряда нежелательных эффектов. В связи с этим отдельный интерес представляют препараты, разработанные на основе регуляторных пептидов. В частности, на основе производного тафтцина Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (тафтцин-ПГП) создан анксиолитик селанк, обладающий широким спектром биологической активности и полифункциональностью. Согласно современным исследованиям, тафтцин-ПГП проявляет не только анксиолитическую и ноотропную активность, но и оказывает местное влияние. Так, установлено его антиульцерогенное действие в условиях стресса, иммунотропная активность, антикоагулянтные эффекты (Коломин Т. А. и др., 2010; Мясоедов Н. Ф. и др., 2014; Петровский А. К. и др., 2015; Рогозинская Э. Я. и др., 2017; Санжиева Л. Ц. и др., 2015). Безопасность применения и плеiotропность эффектов послужили основанием для

выбора тафтцина-ПГП с целью коррекции стресс-индуцированных качественных и количественных изменений состава мукозной микробиоты толстой кишки.

Цель работы – изучение взаимосвязи изменений состава микробиоты, морфометрических показателей толстой кишки и функций нервной системы крыс в условиях иммобилизационного стресса и применения тафтцина-ПГП.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние хронического иммобилизационного стресса на состав мукозной микробиоты и морфометрические показатели толстой кишки у крыс.

2. Изучить влияние тафтцина-ПГП на состав мукозной микробиоты и морфометрические показатели толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса.

3. Исследовать влияние тафтцина-ПГП на функциональное состояние нервной системы крыс с использованием поведенческих методик в условиях хронического иммобилизационного стресса.

4. Определить содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения тафтцина-ПГП.

5. Выявить корреляционные взаимосвязи исследованных показателей в условиях хронического иммобилизационного стресса и применения тафтцина-ПГП и оценить их патогенетическое значение.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование состояния толстокишечного микробиоценоза в условиях хронического иммобилизационного стресса с изучением удельного содержания представителей микробиоты, частоты их встречаемости и относительного среднего. Впервые изучено влияние тафтцина-ПГП на количественный и качественный состав мукозной микробиоты и морфофункциональное состояние стенки толстой кишки при хроническом иммобилизационном стрессе. Впервые выполнено комплексное исследование эффектов тафтцина-ПГП на поведенческие реакции и содержание кортикостерона в сыворотке крови у крыс в условиях стресса. Впервые определены дозы тафтцина-ПГП, обладающие выраженным корригирующим влиянием на стрессиндуцированные сдвиги исследованных показателей в условиях хронического иммобилизационного стресса. Впервые выполнен патофизиологический анализ

корреляционных взаимоотношений изменения исследованных показателей в условиях стресса и применения тафтцина-ПГП.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты способствуют расширению существующих представлений о механизмах развития стрессиндуцированного дисбиоза. Экспериментальные данные способствуют обоснованию применения тафтцина-ПГП с целью коррекции стресс-индуцированных сдвигов в составе толстокишечного микробиоценоза.

На основании результатов исследования получен патент «Применение пептида Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанка) для коррекции дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе» (патент РФ на изобретение №2681217 от 05.03.2019 г.).

Результаты работы подтверждают полифункциональность биологических эффектов регуляторных пептидов, расширяют представления о функционировании оси кишечник-мозг и способствуют разработке новых патогенетически обоснованных подходов к коррекции дизрегуляционной патологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хронический иммобилизационный стресс вызывает изменение качественного и количественного состава мукозной микробиоты и морфофункционального состояния толстой кишки.

2. Использование тафтцина-ПГП корригирует стрессиндуцированные изменения состава мукозной микробиоты, морфометрических показателей состояния толстой кишки, уровней тревожности и кортикостерона.

3. Стрессиндуцированные изменения состояния микробиоты и функций нервной системы при применении тафтцина-ПГП сопровождаются значительными изменениями корреляционных взаимосвязей между ними.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности сформулированных в результате проведенной работы научных положений и выводов определяется полнотой литературно-библиографической справки, общепринятыми в мировой и российской практике методами создания экспериментальных моделей, получения исследуемого материала и его изучения, статистической обработки полученных результатов, которые адекватны задачам диссертационного исследования.

Материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на 83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», посвящённой 83-летию КГМУ и 85-летию со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора А.В. Завьялова (Курск, 2018); Всероссийской научно-практической конференции «Павловские чтения» (Курск, 2018); 9-й Международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине», посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета (Курск, 2018); 84-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», посвящённой 84-летию Курского государственного медицинского университета и 100-летию со дня рождения профессора Г.М. Ткаченко (Курск, 2019); III Всероссийской научно-практической конференции с элементами научной школы для молодых ученых и специалистов «Эндогенные бактериальные инфекции: клинико-микробиологические и иммунологические аспекты» (Оренбург, 2019), V Всероссийской научно-практической конференции «Павловские чтения» (Курск, 2019).

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии; патофизиологии; нормальной физиологии; гистологии, эмбриологии; биологической химии федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 16 от «28» мая 2019 г.).

Внедрение результатов исследования. Материалы диссертации используются в лекционных курсах кафедр микробиологии, вирусологии, иммунологии, патофизиологии, фармакологии Курского государственного медицинского университета; кафедры микробиологии и вирусологии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера, научно-исследовательской работе сектора регуляторных пептидов отдела химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 03.02.03 –

микробиология и 14.03.03 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследования специальностей, конкретно – пунктам 2, 6, 7 и пунктам 2, 7, 8, 10 паспортов соответствующих специальности.

Публикации. По материалам диссертации в центральной и региональной печати опубликовано 11 работ, включая 4 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации (2 из них – в журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus), 1 – патент РФ на изобретение.

Личный вклад автора в исследование. Личный вклад автора осуществлялся на всех этапах работы в форме определения направления и планирования исследования, непосредственного выполнения серий эксперимента на всех этапах. Выполнены статистическая обработка, анализ и трактовка полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации, написаны статьи и тезисы, диссертация и автореферат. Личный вклад автора составляет 80-85%.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, библиографического списка, включающего 198 источников, в том числе 84 отечественных и 114 зарубежных источника. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 14, рисунков – 15.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на 91 крысах-самцах линии Вистар массой 240-280 г, полученных из Питомника лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН г. Пущино. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012) под контролем регионального этического комитета.

В работе использовали гептапептид Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (тафтцин-ПГП), синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН и являющийся действующей субстанцией фармакологического препарата селанк, который растворяли в физиологическом растворе и вводили экспериментальным животным внутривентрально в дозах 80, 250 и 750 мкг/кг за 12-15 минут до начала каждого стрессорного воздействия на протяжении 14 суток в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Контрольным нестрессированным и стрессированным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора.

Моделирование иммобилизационного стресса (ХИС) осуществляли с использованием модификации методик Chen H. et al. (2008), Wang S.W. (2002) и Zheng J. et al. (2009). Животные помещались в соответствующие их размерам индивидуальные пластиковые боксы, и фиксировали в положении на спине. Время экспозиции составляло по 2 часа в течение 14 дней (Kim M. H. et al., 2014).

Исследования функционального состояния нервной системы крыс.

Поведение животных в тесте «открытое поле» оценивали в экспериментальной установке фирмы PanLab (Испания). Регистрировали в течение 5 минут общую пройденную дистанцию, общее число вставаний на задние лапы, продолжительность реакции груминга, число фекальных болюсов, количество уринаций, число пересеченных центральных квадратов, время, проведенное в центральных квадратах, пройденную дистанцию в центральных квадратах, число пересеченных периферических квадратов, время, проведенное в периферических квадратах, пройденную дистанцию в периферических квадратах, число вставаний на задние лапы в периферических квадратах с использованием программы для видеослежения SMART 3.0 и программного расширения для детектирования тела животного (PanLab, Испания).

При исследовании поведения животных в **приподнятом крестообразном лабиринте** в течение 5 минут регистрировали суммарное время пребывания в закрытых и открытых рукавах и время нахождения на центральной площадке с использованием программы для видеослежения SMART 3.0 (PanLab, Испания).

Болевую чувствительность оценивали с помощью теста «отдергивания хвоста» (**tail-flick**). Болевое раздражение формировали тепловым излучением интенсивностью 50

единиц с помощью прибора LE7106 «Tail-flick Meter» (PanLab, Испания), локализация раздражителя приходилась на середину хвоста животного, регистрация латентного периода отдергивания хвоста производилась прибором автоматически. Измерение проводили трехкратно с вычислением среднего значения. Интервал между посадками животного составлял 15 минут.

Моторную координацию и выносливость животных оценивали с использованием аппарата «**Rotarod**» LE8200 (PanLab, Испания) после предварительного обучения держаться на «вращающемся стержне» крыс, успешно освоивших обучение, через 30 мин тестировали на ускоряющей скорости от 4 до 40 об / мин в течение 5 минут. Тестирование проводили трёхкратно с интервалом между посадками 15 минут. В ходе опыта автоматически фиксировалось латентное время падения с вращающегося стержня на основание прибора.

Методика забора биологического материала. Животные выводились из эксперимента под наркозом путем обескровливания. Забор крови осуществлялся из правого желудочка сердца с использованием закрытых систем для взятия крови S-Monovette® с активатором свертывания для получения сыворотки производства SARSTEDT (Германия). Непосредственно после забоя животного производили забор участка толстой кишки, который использовали для микробиологического и морфологического исследований.

Количественное и качественное исследование мукозной микробиоты толстой кишки крыс проводилось по методике Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. (Воробьев А. А. и др., 2005). Биоптаты слизистой оболочки толстой кишки освобождались от химуса, взвешивались в асептических условиях и помещались в стерильный раствор фосфатного буфера pH 7,0 в соотношении 1:10 на 2 часа для разжижения муцина. Из исследуемого материала готовились мазки, которые окрашивались по Граму, и производилось разведение исследуемого материала до концентраций 10^{-2} - 10^{-4} . По 0,1 мл каждого разведения взвеси засеивали газоном на поверхность питательных сред (Эндо, SSA-агар, висмут-сульфит агар, ЦПХ-агар, кровяной агар, желточно-солевой агар, Сабуро, лактоагар MRS, бифидоагар) и инкубировали при температуре 37⁰С в аэробных и анаэробных условиях. Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью масс-спектрометра Maldi Biotyper Microflex (Bruker, США).

Количество бактерий в 1 грамме материала рассчитывали исходя из числа выросших колоний микроорганизмов – колониеобразующих единиц (КОЕ) при посеве из максимального разведения, где отмечался рост не менее 10 колоний, учитывая при этом объём посевного материала. Для расчёта использовали формулу: $K = E / k * v * n$, где K – колониеобразующая единица, E – общее количество бактерий, k – количество внесённого материала, v – количество чашек Петри, n – разведение. Удельное содержание микроорганизмов вычисляли как количество микроорганизмов, выделенных из биопроб, и выражали как lg КОЕ/г массы биологического материала (Воробьев А. А. и др., 2005). Расчет частоты встречаемости рода производили по формуле: $ЧВ = n_i \times 100 / N$, где n_i – число животных с выявленным i -м родом микроорганизма, N – общее число животных. Относительное среднее для каждого идентифицированного рода микроорганизмов вычисляли по формуле: $ОСр = АСр_i \times 100 / N$, где $АСр_i$ – абсолютное среднее для i -го микроорганизма, N – число микроорганизмов в популяции (Мэгарран Э., 1992).

Морфологическое исследование толстой кишки проводили с использованием гистологических срезов толстой кишки, окрашенных гематоксилином и эозином. Микроскопирование и микрофотосъёмку проводили с помощью микроскопа Leica CME и окуляр-камеры DCM – 510 с документированием снимков в программе FUTURE WINJOE. На микрофотографиях оценивали архитектуру толстой кишки, глубину крипт, количество бокаловидных клеток, наличие и выраженность воспалительных и некротических изменений. Морфометрическое исследование заключалось в подсчёте клеточного состава воспалительного инфильтрата. По кариологическим признакам дифференцировали нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, плазмциты. Процентное соотношение указанных представителей клеточной популяции рассчитывали после подсчёта 100 клеток в нескольких непересекающихся полях зрения.

Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови крыс производили методом ИФА с помощью набора Corticosterone ELISA Kit ADI-900-097 (Enzo, США).

Статистическую обработку данных проводили в программе MS Excel и STATISTICA 13.3 Trial. В зависимости от типа распределения признаков статистическую достоверность результатов определяли с использованием непарного параметрического t -критерия Стьюдента, непараметрического критерия Манна-Уитни, дисперсионного анализа

(анализа по Краскелу-Уоллису). Контроль групповой вероятности ошибки осуществляли с помощью метода Холма-Бонферрони. Корреляционные связи между признаками рассчитывали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) (Мастичкий С.Э., 2015; Crawley M.J., 2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние хронического иммобилизационного стресса (ХИС) на состояние микробиоценоза толстой кишки крыс.

В условиях использованной модели ХИС произошли существенные изменения в составе микробиоценоза толстой кишки (рисунки 1А, 1Б, 2).

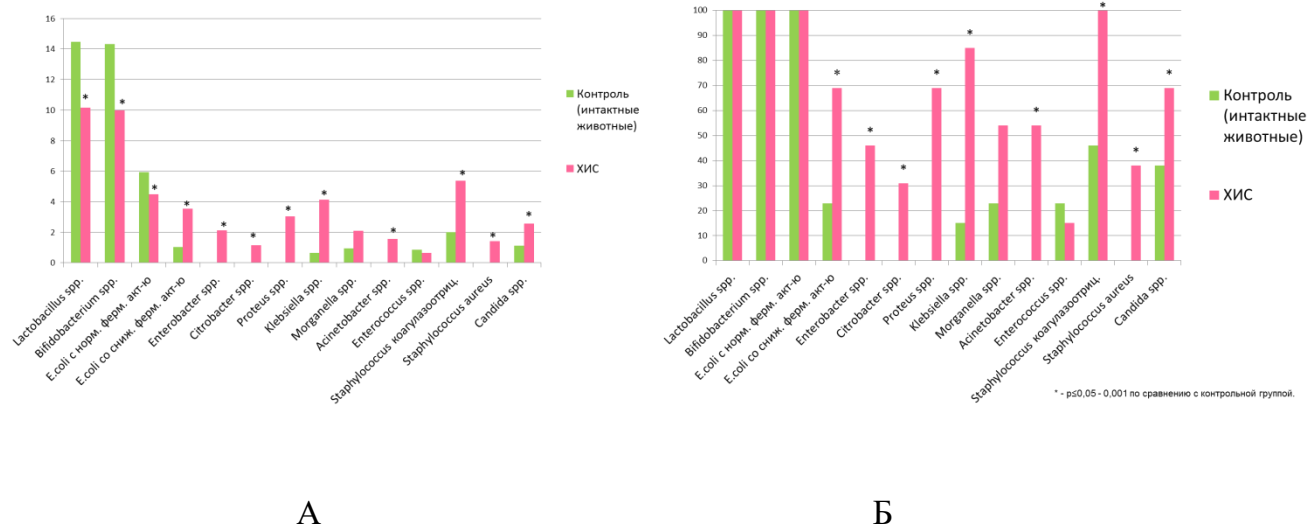


Рисунок 1 – Удельное содержание (lg КОЕ/г, $M \pm m$) и частота встречаемости (% , $P \pm m_p$) представителей мукозной микробиоты толстой кишки в условиях ХИС

Изменения качественного и количественного состава мукозной микробиоты под влиянием ХИС характеризовались снижением удельного содержания облигатных лактобактерий и бифидобактерий и эшерихий с нормальной ферментативной активностью (рисунок 1А). При этом отмечалось увеличение числа кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью. Изменение численности факультативных представителей микробиоценоза под влиянием ХИС характеризовалось повышением значений определяемого показателя для клебсиелл, коагулазоотрицательных стафилококков, грибов рода *Candida*. Кроме того, в группе стрессированных животных были зарегистрированы

отсутствовавшие в группе контроля бактерии, принадлежащие родам *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter*, а также *Staphylococcus aureus*.

Анализ частоты встречаемости облигатных представителей мукозной микробиоты интактных и стрессированных животных не выявил различий между значениями определяемого показателя в отношении лактобацилл, бифидобактерий и эшерихий с нормальной ферментативной активностью (рисунок 1Б). Однако кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью в условиях ХИС регистрировалась достоверно чаще, чем в контроле. Воздействие иммобилизационного стресса существенно отразилось на частоте встречаемости факультативных представителей микробиоценоза: бактерии рода *Klebsiella*, грибов рода *Candida*. Кроме того, ряд условно-патогенных бактерий, к числу которых относятся энтеробактер, протей, цитробактер, ацинетобактер и золотистый стафилококк, обнаружены только у стрессированных животных.

Характер распределения микроорганизмов в исследуемых популяциях был изучен с помощью относительного среднего для каждого идентифицированного рода представителей мукозной микробиоты толстой кишки (рисунок 2).

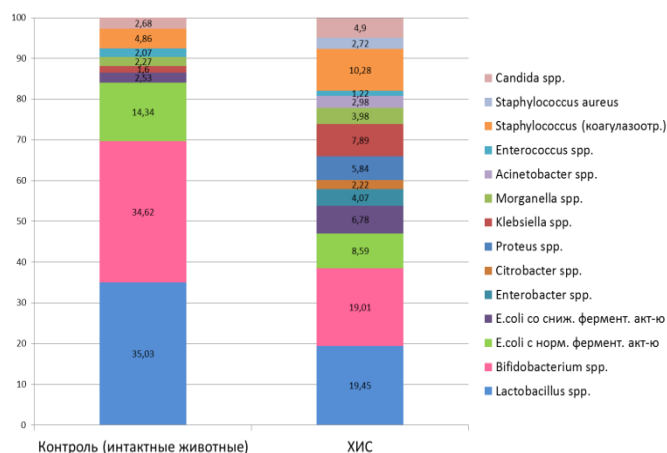


Рисунок 2 – Относительное среднее (доля) для каждого рода представителей мукозной микробиоты толстой кишки крыс в условиях иммобилизационного стресса, %

Ведущую долю исследуемой популяции в группе интактных животных составили типичные симбионты толстой кишки – лактобациллы, бифидобактерии и кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью. В условиях ХИС доля *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* значительно сократилась, однако они сохранили доминирующее положение. При этом *E. coli* с нормальной ферментативной активностью уступили ведущее

положение коагулазоотрицательным стафилококкам. Формирование ХИС способствовало колонизации слизистой толстой кишки и другими условно-патогенными микроорганизмами: клебсиеллами, морганеллами, грибами рода *Candida*; а также появлению в структуре популяции отсутствовавших у интактных животных энтеробактера, цитробактера, протей, ацинетобактера и золотистого стафилококка.

Морфометрическое исследование образцов толстой кишки показало, что под влиянием ХИС произошли изменения острого воспалительного характера (таблица 1).

Таблица 1 – Морфометрические показатели толстой кишки крыс в условиях ХИС

Показатель	Интактные животные (контроль)	ХИС
Глубина крипт	173,51±0,41	156,115±0,37**
Бокаловидные клетки	66,55±0,51	61,27±0,54**
Тучные клетки тип 1	5,15±0,35	12,92±0,54**
Тучные клетки тип 2	5,85±0,74	12,23±0,63**
Тучные клетки тип 3	5,46±0,61	17,38±0,59**
Тучные клетки тип 4	2,61±0,50	21,38±0,66**
Нейтрофилы	1,24±0,39	2,15±0,34
Лимфоциты	19,85±0,67	33,92±0,69**
Макрофаги	3,54±0,56	13,77±0,68**
Плазмоциты	10,85±0,49	14,54±0,68

*Примечание: * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** - $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой.*

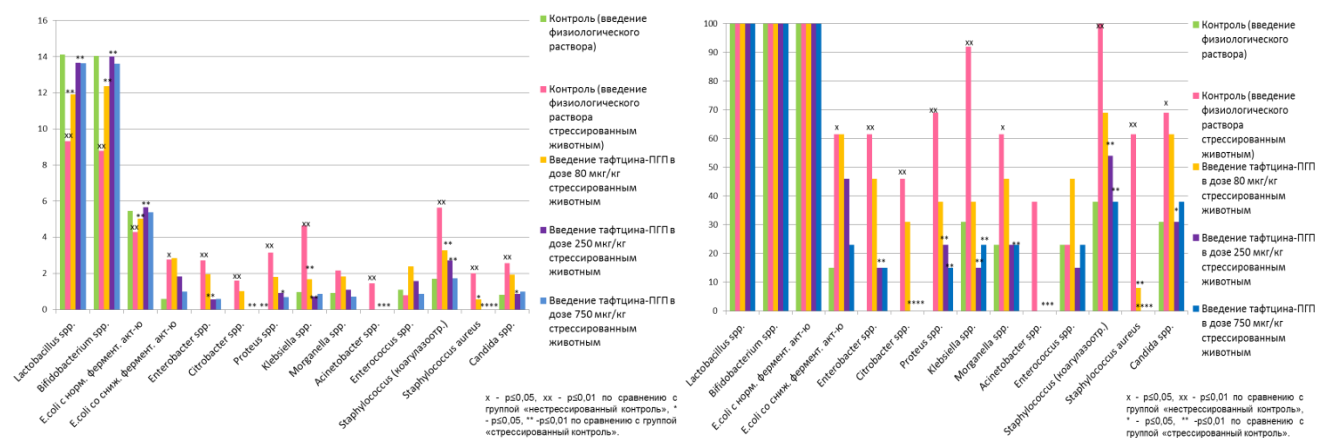
Отмечалось расширение крипт, уменьшалось количество бокаловидных клеток. Клеточный состав представлен преимущественно лимфоцитами, макрофагами и единичными нейтрофилами. Отмечалось резкое увеличение числа тучных клеток. При этом большая часть из них находилась в дегранулированной форме.

Состояние микробиоты толстой кишки крыс в условиях ХИС и при применении тафтцина-ПГП.

Состояние мукозной микробиоты животных, которым вводили физиологический раствор и моделировали ХИС, характеризовалось снижением количества облигатных лактобактерий, бифидобактерий, кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью на фоне увеличения содержания эшерихий со сниженной ферментативной активностью, факультативных клебсиелл, коагулазоотрицательных стафилококков, грибов

рода *Candida*, а также появления микроорганизмов, идентифицированных как *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter* и *Staphylococcus aureus* (рисунок 3А).

Применение тафтцина-ПГП во всех исследуемых дозах эффективно корригировало стрессиндуцированный дисбиоз. Так, введение тафтцина-ПГП в дозе 80 мкг/кг нормализовало 7 из 12 разбалансированных представителей микробиоты толстой кишки (лактобацилл, бифидобактерий, кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью, клебсиелл, ацинетобактера, коагулазоотрицательных и золотистых стафилококков). При применении тафтцина-ПГП в дозе 250 мкг/кг произошло восстановление 11 из 12 разбалансированных под влиянием ХИС представителей микробиоты (лактобациллы, бифидобактерии, кишечные палочки с нормальной ферментативной активностью, энтеробактер, цитробактер, протей, клебсиеллы, ацинетобактер, коагулазоотрицательные и золотистые стафилококки, грибы рода *Candida*). Тафтцин-ПГП в дозе 750 мкг/кг, помимо названных показателей, привел к достоверному снижению содержания кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью.



А

Б

Рисунок 3 – Удельное содержание (lg КОЕ/г, $M \pm m$) и частота встречаемости (% $P \pm m_p$) представителей мукозной микробиоты толстой кишки в условиях ХИС и применения тафтцина-ПГП

Влияние ХИС существенно отразилось на частоте встречаемости факультативных представителей микробиоценоза (рисунок 3Б). Наиболее эффективно значения определяемого показателя корригировались при применении тафтцина-ПГП в дозах 250 и 750 мкг/кг за счет снижения частоты встречаемости условно-патогенных энтеробактера,

цитробактера, протейя, клебсиелл, морганелл, ацинетобактера, коагулазоотрицательных и золотистых стафилококков, грибов рода *Candida*.

Во всех исследуемых группах ведущую долю популяции составили лактобациллы и бифидобактерии (рисунок 4). Однако в условиях ХИС их относительное среднее значительно сократилось, как и количество *E.coli* с нормальной ферментативной активностью, при этом доля *E.coli* со сниженной ферментативной активностью возросла.

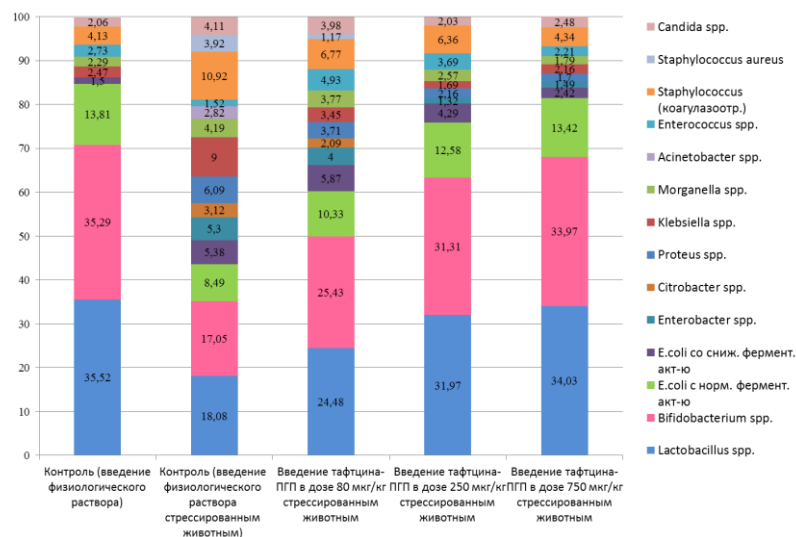


Рисунок 4 – Относительное среднее (доля) каждого рода представителей мукозной микробиоты в условиях ХИС и применения тафтцина-ПГП, %

Применение тафтцина-ПГП в дозе 80 мкг/кг существенно не изменило структуру микробиоценоза по сравнению со стрессированным контролем. В результате введения тафтцина-ПГП в дозе 250 мкг/кг доля факультативных представителей микробиоты сократилась за счет увеличения количества облигатных микроорганизмов, однако относительное среднее не достигло значений, соответствующих животным, не подвергшимся ХИС. Наиболее близкие к нестрессированному контролю значения определяемого показателя зарегистрированы при применении тафтцина-ПГП в дозе 750 мкг/кг.

Изменения морфофункционального состояния толстой кишки в условиях ХИС и при применении тафтцина-ПГП.

Результаты проведенного морфометрического исследования указывают на то, что ХИС способствовал развитию атрофических явлений, зарегистрированы признаки

воспалительной реакции, изменялось количество и функциональная активность тучных клеток (таблица 2). Применение тафтцина-ПГП привело к ускорению адаптации и снизило патоморфологические проявления стрессорного воздействия. Причем наиболее выраженное влияние нейропептида на состояние толстой кишки отмечалось при применении тафтцина-ПГП в дозах 250 мкг/кг и 750 мкг/кг.

Таблица 2 – Морфометрические показатели толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса и при применении тафтцина-ПГП

Показатель	Контроль (физиологический раствор без стресса)	Хронический иммобилизационный стресс			
		Контроль (физиологический раствор+стресс)	тафтцин-ПГП, мкг/кг		
			80	250	750
Глубина крипт	167,31±0,84	154,71±0,61 ^{xx}	153,9±0,55	166,59±0,72 ^{**}	168,54±0,63 ^{**}
Бокаловидные клетки	64,5±0,66	59,91±0,55 ^{xx}	60,58±0,60	64,49±0,59 ^{**}	64,37±0,58 ^{**}
Тучные клетки тип 1	5,77±0,3	13,15±0,52 ^{xx}	10,23±0,41	5,54±0,56 ^{**}	4,38±0,53 ^{**}
Тучные клетки тип 2	7,15±0,67	9,85±0,83 ^x	9,92±0,62	7,69±0,63	4,92±0,51 ^{**}
Тучные клетки тип 3	7,77±0,6	15,61±0,525 ^{xx}	16,15±0,5	10,23±0,56 ^{**}	6,15±0,61 ^{**}
Тучные клетки тип 4	6,31±0,51	22,77±0,6 ^{xx}	19,15±0,79	8,85±0,62 ^{**}	4,38±0,71 ^{**}
Нейтрофилы	1,69±0,35	3,77±0,53 ^{xx}	2,69±0,46	2,15±0,44	1,69±0,51
Лимфоциты	22,77±1,27	33,08±0,67 ^{xx}	29,08±0,47 ^{**}	24,38±0,51 ^{**}	22,08±0,65 ^{**}
Макрофаги	8,15±0,93	13,46±0,49	14,54±0,53	15,46±0,74	17,08±0,4 ^{**}
Плазмоциты	10,77±0,59	14,46±0,51	13±0,49	12,54±0,66	18,38±0,75

Примечание: ^x- $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «нестрессированный контроль», ^{xx}- $p \leq 0,01$ по сравнению с группой «нестрессированный контроль», ^{*} - $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «стрессированный контроль», ^{**}- $p \leq 0,01$ по сравнению с группой «стрессированный контроль».

Функциональное состояние нервной системы у крыс в условиях ХИС и при применении тафтцина-ПГП. Исследование поведенческих показателей у крыс проводили два раза - до начала опытов и по их окончании. Результаты тестирования в начале эксперимента показали отсутствие существенных различий в подопытных группах животных, что свидетельствовало о равнозначных исходных условиях эксперимента.

Влияние ХИС и применения тафтцина-ПГП на поведение крыс в открытом поле. Используемая в работе модель ХИС вызывала увеличение горизонтальной двигательной активности в периферических отделах (таблица 3).

Введение тафтцина-ПГП в дозе 80 мкг/кг достоверно повышало двигательную активность в центральных отделах при тенденции к активации ориентировочно-исследовательского поведения и снижения эмоциональности в периферических квадратах на фоне отсутствия влияния на продолжительность груминга (таблица 3, 4).

Таблица 3 – Влияние тафтцина-ПГП на ориентировочно-исследовательскую и двигательную активность стрессированных крыс в открытом поле (Ме (Q1-Q3))

Показатель \ Группа	Контроль	Контроль+ стресс	80 мкг/кг	250 мкг/кг	750 мкг/кг
Центральные квадраты					
Число пересеченных квадратов	0 (0; 1)	1 (0; 5)	5* (1; 9)	2 (0; 4)	1 (0; 3)
Время, проведенное в центральных квадратах	0 (0; 0,83)	1,68 (0; 4,53)	6,33* (1,56; 8,43)	5,47* (3,4; 7,86)	5,42* (1,4; 8,37)
Пройденная дистанция	0 (0; 5,95)	16,08 (0; 78,74)	69,6* (14,2; 187,46)	17,33 (0; 63,56)	11,7 (0; 48,79)
Периферические квадраты					
Число пересеченных квадратов	0 (0; 1)	2 ^x (1; 3)	3 (1; 5)	2 (0; 2)	1 (0; 3)
Время, проведенное в периферических квадратах	300 (299,17; 300)	298,32 (295,47; 300)	293,67* (291,57; 298,44)	295* (292,14; 296,93)	298,9 (295,44; 300)
Пройденная дистанция	426,71 (333,29; 971,9)	720,79 (468,58; 871,12)	1078,24 (526,02; 1892,81)	423,42* (364,02; 563,2)	606,19 (231,46; 938,12)
Число вставаний	5 (2; 8)	6,5 (5; 11)	10 (3; 21)	2* (1; 6)	6 (3; 10)
Общие показатели					
Пройденная дистанция	453,28 (333,29; 977,85)	723,86 (468,58; 1474,11)	1208,18 (551,23; 2080,26)	481,14* (215,6; 608,83)	626,84 (241,36; 724,61)
Число вставаний	5 (2; 8)	6,5 (5; 11)	10 (3; 21)	3* (2; 6)	6 (3; 10)

Примечание: ^x – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу; * – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.

Таблица 4 – Влияние тафтцина-ПГП на эмоциональность стрессированных крыс в открытом поле (Ме (Q1-Q3))

Показатель \ Группа	Контроль	Контроль+ стресс	80 мкг/кг	250 мкг/кг	750 мкг/кг
Продолжительность груминга	16,5 (10; 20)	18 (13; 70)	21 (0; 38)	0* (0; 15)	5 (0; 27)

Количество уринаций	0 (0; 0)	0,5 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 1)
Количество фекальных болюсов	0 (0; 1)	0 (0; 2)	0 (0; 1)	1 (0; 1)	0 (0; 1)

*Примечание: ^x – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу; * – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.*

В дозе 250 мкг/кг пептид также оказывал существенное влияние на поведение животных. При этом существенно увеличивалось время пребывания в центральных отделах, однако наиболее выраженные изменения поведенческой активности наблюдалось в периферических квадратах в виде снижения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности на фоне значительного ослабления груминга.

При увеличении вводимой дозы тафтцина-ППП до 750 мкг/кг достоверно значимых значений достигало только уменьшение времени нахождения крыс в центральных квадратах установки. Изменения остальных исследованных показателей были менее выраженными и не достигали достоверного уровня различий в сравнении с контрольной группой, что свидетельствует об ослаблении его эффектов в отношении данных поведенческих реакций.

Изменение поведенческих показателей крыс в приподнятом крестообразном лабиринте после введения тафтцина-ППП в условиях ХИС. В условиях ХИС время нахождения животных в закрытых рукавах достоверно увеличилось, а время нахождения в открытых рукавах статистически значимо сократилось, что свидетельствует о существенном стрессиндуцированном увеличении тревожности (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние тафтцина-ППП на поведение стрессированных крыс в приподнятом крестообразном лабиринте (Me (Q1-Q3))

Показатель Группа	Время в открытых рукавах, с	Время в закрытых рукавах, с	Время на центральной площадке, с
Контроль	31,66 (10,25; 62,47)	191,83 (113,88; 235,15)	73,225 (40,72; 90,68)
Контроль + стресс	9,65 ^x (6; 23,82)	237,38 ^x (216,97; 255,33)	45,48 (36,15; 68,08)
80 мкг/кг	11,52 (6,44; 38,55)	203,32 (158,92; 257)	83,68 (36,56; 113,28)
250 мкг/кг	25,5* (18,76; 45)	205* (103,14; 228,66)	56,52 (32,52; 156)

750 мкг/кг	37,23* (16,04; 51,21)	205,25 (127,08; 251)	58,785 (16,15; 134,3)
------------	--------------------------	-------------------------	--------------------------

*Примечание: ^x – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу; * – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.*

Введение тафтцина-ПГП способствовало снижению вызванного стрессом повышения уровня тревожности у крыс. При этом наибольший эффект наблюдался в дозе 250 мкг/кг: время нахождения животных в открытых рукавах достоверно возрастало, а время нахождения в закрытых рукавах статистически значимо снижалось. Увеличение вводимой дозы пептида до 750 мкг/кг не сопровождалось значительным уменьшением анксиолитического действия и исследуемые показатели имели значения, близкие к таковым у животных, получавших тафтцин-ПГП в дозе 250 мкг/кг.

Изменение моторной координации и выносливости крыс после введения тафтцина-ПГП в условиях ХИС. Используемая модель ХИС вызывала выраженные изменения моторной координации и выносливости в тесте «ротарод» в виде их повышения, что свидетельствует о мобилизации данной функции в условиях стресса и может являться отражением адаптационных процессов в организме (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние тафтцина-ПГП на поведение стрессированных крыс в тесте «ротарод» (Me (Q1-Q3))

Группа Показатель	Контроль	Контроль+ стресс	80мкг/кг	250мкг/кг	750мкг/кг
Латентное время падения (с)	61,15 (50,7; 75)	81,2 ^x (59,7; 124,3)	61,7* (35; 78)	94,3 (40,7; 105,7)	69,8 (27,3; 100,7)

*Примечание: ^x – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, не подвергавшихся стрессу; * – $p < 0,05-0,01$ по сравнению с контрольной группой крыс, подвергавшихся стрессу.*

Тафтцин-ПГП в дозе 80 мкг/кг полностью нивелировал стрессиндуцированное изменение данных показателей. В дозе 750 мкг/кг направленность эффектов пептида сохранилась при существенном снижении выраженности, тогда как применение тафтцина-ПГП в дозе 250 мкг/кг привело к недостоверному увеличению латентного времени падения крыс.

Болевая чувствительность крыс после введения тафтцина-ПГП в условиях ХИС. Тафтцин-ПГП у стрессированных животных во всех использованных дозах не

оказывал влияния на болевые пороги у крыс (таблица 7). После введения пептида во всех использованных дозах существенного изменения латентного периода реакции отдергивания хвоста не наблюдалось.

Таблица 7 – Влияние тафтцина-ПГП на болевую чувствительность стрессированных крыс в тесте «отдергивания хвоста» (Me (Q1-Q3))

Показатель \ Группа	Контроль	Контроль+ стресс	80мкг/кг	250 мкг/кг	750 мкг/кг
Латентное время (с)	3,02 (2,63; 3,96)	2,66 (2,44; 2,89)	2,87 (2,22; 3,48)	2,72 (2, 28; 3,04)	2,75 (2,41; 3,49)

Содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс в условиях ХИС и применения тафтцина-ПГП. По окончании эксперимента содержание кортикостерона в крови стрессированных крыс увеличилось на 40 %, что свидетельствует о существенной перестройке продукции адаптивных гормонов в условиях использованной модели стресса и может указывать на развитие стресса в стадии резистентности (рисунок 5).

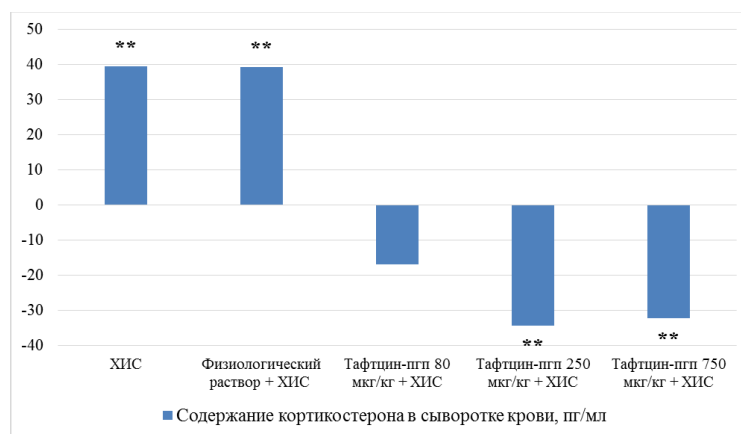


Рисунок 5 – Содержание кортикостерона в сыворотке крови исследуемых животных, пг/мл

Примечание: для животных из группы «ХИС» за ноль приняты значения концентрации кортикостерона в сыворотке крови интактных животных (контроль). Для контрольных стрессированных животных («физ. р-р + ХИС») группой сравнения является группа «нестрессированный контроль» (введение физ. р-ра); для групп, которым вводился тафтцин-пгп – за ноль приняты значения стрессированного контроля.

В контрольной группе с введением физиологического раствора при стрессорном воздействии уровень кортикостерона увеличился на 39 %, т.е. степень его увеличения оказалась близкой к таковой в первой серии, что позволяет предполагать отсутствие

существенного влияния введения физиологического раствора на развитие стресса у животных.

Тафтцин-ПГП оказывал дозозависимое влияние на содержание гормона в крови. Так, после введения наименьшей использованной дозы 80 мкг/кг уровень гормона снижался на 17 %, однако данные различия с контрольной группой имели недостоверный характер. Увеличение вводимой дозы пептида до 250 мкг/кг сопровождалось наибольшим в данной серии экспериментов снижением содержания кортикостерона – на 34 %. Дальнейшее увеличение вводимой дозы тафтцина-ПГП до 750 мкг/кг вызывало снижение уровня гормона на 32 % и не оказывало влияния на степень изменения данного показателя эндокринной функции.

Корреляционная взаимосвязь между составом микробиоты, морфометрическими показателями толстой кишки и состоянием функций нервной системы крыс в условиях ХИС и при применении тафтцина-ПГП.

Использованная в работе модель ХИС вызывала формирование значительного количества разнонаправленных корреляционных связей между показателями состояния микробиоты, стенки толстой кишки, уровнем кортикостерона в сыворотке крови и состоянием нервной системы. Их характер свидетельствует о значительной активации в организме адаптивных реакций в ответ на хроническое стрессорное воздействие. Применение тафтцина-ПГП оказывало существенное влияние на корреляционные взаимоотношения исследованных показателей, которое в значительной степени зависело от величины использованной дозы.

ВЫВОДЫ

1. Формирование ХИС модулировало состав мукозной микробиоты толстой кишки, что характеризовалось снижением количества облигатных представителей на фоне появления или повышенного содержания факультативных микроорганизмов. При этом воздействие стресса не изменяло частоты встречаемости доминантных представителей нормобиоценоза, но отразилось на значениях данного показателя в отношении других идентифицированных представителей микробиоценоза, а также на структуре исследуемых популяций.

2. Применение тафтцина-ПГП в дозах 250 мкг/кг и 750 мкг/кг корригировало состояние стрессиндуцированного дисбиоза за счет увеличения удельного содержания и доли облигатных представителей мукозной микробиоты. При этом значения определяемых показателей в отношении факультативных микроорганизмов характеризовались снижением их удельного содержания, частоты встречаемости и относительного среднего.

3. Морфофункциональные изменения в стенке толстой кишки на 14 день стрессорного воздействия проявились развитием атрофических явлений, признаками экссудативной воспалительной реакции, повышением количества и активности тучных клеток. Применение тафтцина-ПГП способствовало ослаблению патоморфологических проявлений стрессорного воздействия с наибольшей выраженностью эффектов в дозах 250 мкг/кг и 750 мкг/кг.

4. Тафтцин-ПГП в условиях стресса способствовал нивелированию вызванных стрессом изменений поведенческих реакций у крыс за счет коррекции уровней тревожности (в дозах 250 и 750 мкг/кг), моторной координации (в дозе 80 мкг/кг), ориентировочно-исследовательской активности и эмоциональности (во всех дозах) и не оказывал влияние на температурную болевую чувствительность.

5. Используемая модель ХИС вызывала повышение продукции адаптивных гормонов, характерное для стресса в стадии резистентности. Введение тафтцина-ПГП снижало уровни кортикостерона в сыворотке крови с наибольшей выраженностью эффекта в дозах 250 и 750 мкг/кг.

6. Развитие стрессиндуцированных сдвигов выражалось в значительном увеличении количества разнонаправленных корреляционных связей между исследованными показателями. Применение тафтцина-пгп в условиях стресса приводило к снижению общего количества корреляционных взаимосвязей и дозозависимо влияло на их характер.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывать эффекты тафтцина-ПГП на состояние микробиоты толстой кишки при хроническом стрессе при применении его у больных с тревожными состояниями.

2. Использовать в учебном процессе медицинских и биологических вузов данные о полифункциональности регуляторных пептидов на примере дозозависимых и плейотропных эффектов тафтцина-ПГП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Липидный состав мембран эритроцитов животных при экспериментальном дисбиозе / А.В. Шевченко, О.А. Медведева, **А.Ю. Мухина**, Е.С. Никитина, Н.А. Вережкина // Инновации в медицине: материалы восьмой международной дистанционной научной конференции, посвященной 82-летию Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2017. – С. 8-12.

2. Морфологические особенности толстой кишки крыс при стресс-индуцированном дисбиозе / **А.Ю. Мухина**, Бобынцев И.И., Медведева О.А., Мишина Е.С., Свищева М.В. // **Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»**. – 2019. – № 2. – С. 80-86.

3. **Мухина А.Ю.** Влияние гипокинезии и иммобилизационного стресса на состояние микробиоценоза толстой кишки крыс / А.Ю. Мухина, А.В. Шевченко, М.В. Свищева // Молодежная наука и современность: материалы 83-й всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвящённой 83-летию КГМУ и 85-летию со дня рождения член-корреспондента РАМН, профессора А.В. Завьялова. – Курск, 2018. – Ч. 1. – С. 69.

4. **Мухина А.Ю.** Влияние иммобилизационного стресса на состояние микробиоты толстой кишки крыс / А.Ю. Мухина, А.В. Шевченко, М.В. Свищева // Взаимодействие науки и общества: проблемы и перспективы: материалы международной научно-практической конференции. – Челябинск, 2018. – Ч.2. – С. 131-133.

5. **Мухина А.Ю.** Влияние хронического иммобилизационного стресса на состав пристеночной микрофлоры толстой кишки лабораторных животных / А.Ю. Мухина, К.Н. Борисова // Молодежная наука и современность: материалы 84-й Международной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвящённой 84-летию КГМУ и 100-летию со дня рождения профессора Г.М. Ткаченко. – Курск, 2019. – Ч. 1. – С. 74-77.

6. **Мухина А.Ю.** Микробиология толстой кишки крыс в условиях хронического иммобилизационного стресса / А.Ю. Мухина, А.В. Шевченко, М.В. Свищева // Инновации в медицине: материалы девятой международной дистанционной научной конференции,

посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2018. – С. 73-76.

7. Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки экспериментальных животных в условиях иммобилизационного стресса / **А.Ю. Мухина**, О.А. Медведева, М.В. Свищева, А.В. Шевченко, Н.Н. Ефремова, И.И. Бобынцев, П.В. Калущкий // **Астраханский медицинский журнал**. – 2019. - № 1. – С. 54-60.

8. Состав нормобиоценоза толстого кишечника и прооксидантно-антиоксидантный баланс плазмы крови, колоноцитов при экспериментальном дисбиозе и использовании пробиотика РиоФлора Иммуно Нео / А.В. Шевченко, О.А. Медведева, **А.Ю. Мухина**, В.А. Королев, П.В. Калущкий // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии**. – 2018. - №4. – С. 27-33.

9. Состояние антиоксидантной защиты животных при экспериментальном дисбиозе и его коррекции эмоксипином / А.В. Агейченко, О.А. Медведева, **А.Ю. Мухина**, М.В. Свищева // **Образование и наука в современных реалиях : материалы II Международной научно–практической конференции**. — Чебоксары, 2017. — С. 12–15.

10. State of Colon Microbiota in Rats during Chronic Restraint Stress and Selank Treatment. / A.Yu. Mukhina [et al.] // **Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny**. – 2019. - Vol. 167, Iss. 2. – P. 175-178.

11. **Патент №2681217** РФ, СПК А 61 К 38/08, А 61 Р 1/00. Применение пептида Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанка) для коррекции дисбиоза при хроническом иммобилизационном стрессе / **А.Ю. Мухина**, О.А. Медведева, М.В. Свищева, А.В. Шевченко, П.В. Калущкий, И.И. Бобынцев, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов. – № 2018134991; заявлено 03.10.18; опубл. 05.03.19, Бюл. № 7. – 23 с.