

## ИЗМЕНЕНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И БИОТРАНСФОРМАЦИИ ИВАБРАДИНА У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

© 2017

**Толкачев Борис Евгеньевич**, кандидат медицинских наук,  
доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии

*Волгоградский государственный медицинский университет (г. Волгоград, Российская Федерация)*

**Морковин Евгений Игоревич**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной  
медицины и биологии; старший научный сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований

**Кнышова Лилия Петровна**, аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики  
с курсом клинической лабораторной диагностики ФУВ;

младший научный сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований

*Волгоградский государственный медицинский университет (г. Волгоград, Российская Федерация);*

*Волгоградский медицинский научный центр (г. Волгоград, Российская Федерация)*

**Яковлев Анатолий Трофимович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой  
клинической лабораторной диагностики с курсом клинической лабораторной диагностики ФУВ  
*Волгоградский государственный медицинский университет (г. Волгоград, Российская Федерация)*

**Стрыгин Андрей Валерьевич**, кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой фундаментальной  
медицины и биологии; заведующий лабораторией геномных и протеомных исследований

*Волгоградский государственный медицинский университет (г. Волгоград, Российская Федерация);*

*Волгоградский медицинский научный центр (г. Волгоград, Российская Федерация)*

**Аннотация.** В последнее время активно обсуждается роль кишечной микробиоты в развитии большого числа патологических процессов. Показано, что длительно существующий дисбиоз кишечника, в особенности синдром избыточного бактериального роста, влияет на процесс пищеварения и биотрансформацию ксенобиотиков. Существует целый ряд механизмов, посредством которых кишечная микробиота способна провоцировать ряд метаболических нарушений, приводящих к возникновению тяжёлых заболеваний. Одним из факторов, провоцирующих дисбиоз, является алкоголь, токсическое действие которого связано с изменением активности систем, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков. Целью представленной работы явилась оценка взаимосвязи дисбиотических процессов, возникающих у крыс при хронической алкоголизации, и биотрансформации ивабрадина, субстрата изофермента CYP3A4. Работа выполнена на 30 крысах-самцах стока Вистар, поделенных на две группы – контрольную и экспериментальную, в которой хроническую алкоголизацию моделировали назначением 15% алкоголя в качестве единственного источника жидкости в течение 40 дней. В экспериментальной группе было обнаружено сокращение бифидо- и лактобактерий, находящееся в корреляционной взаимосвязи с показателями, характеризующими биотрансформацию ивабрадина. Данные изменения указывают на участие кишечной микробиоты в метаболизме ивабрадина при пероральном введении.

**Ключевые слова:** ксенобиотики; ивабрадин; биотрансформация; метаболизм; микробиота кишечника; дисбиотические процессы; пробиотические штаммы; синдром избыточного бактериального роста; микробные токсины; эндотоксемия; экспериментальное моделирование; хроническая алкоголизация; печень; CYP3A4.

### Актуальность исследования

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека населен многочисленными микроорганизмами, метаболизм которых тесно интегрирован в метаболизм макроорганизма [1]. В 2006 г. R. Goodacre введено понятие «суперорганизм», под которым понимается сообщество человека и населяющих его микроорганизмов [2], причем доля собственно человеческих клеток в нем составляет всего лишь 10%, а 90% принадлежат бактериям [3]. Исследования последних лет существенно изменили стандартные представления о роли кишечной микробиоты в патогенезе многих заболеваний [4]. Хорошо изучена одна из важнейших метаболических функций кишечной микробиоты, связанная с синтезом короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК): уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров. Образующиеся в результате анаэробного (бифидобактерии, пропионибактерии, бактероиды и др.) брожения доступных для бактерий ди-, олиго- и

полисахаридов КЦЖК определяют снижение pH, обеспечивают колонизационную резистентность, а также принимают участие в регуляции кишечной моторики и всасывание некоторых ионов, таких как кальций, магний, железо, необходимых для поддержания водно-электролитного баланса в организме [5; 6]. В многочисленных исследованиях показана важная роль микробиоты кишечника, т.к. она участвует в иммуностимуляции, синтезе витаминов группы В и витамина К, никотиновой и фолиевых кислот, различных биологически активных соединений: эстрогенов, промазина, морфина, колхицина, дигоксина, регулировании моторики и других функций ЖКТ. Таким образом, кишечный биоценоз поддерживает значительное число биохимических процессов организма и сравнивается по значимости с печенью [7].

Состояние микробного дисбаланса (дисбиоза) характеризуется изменением качественного и/или количественного состава кишечной микробиоты. Наблюдаемые изменения могут включать выраженное

сокращение количества представителей пробиотических штаммов (бифидобактерии, лактобактерии) и повышение патогенной протеолитической микробиоты, являющейся маркером дисбиотических нарушений, под воздействием которой образуются продукты распада белков и аминокислот – индол, скатол, фенол и др. [8]. Данные соединения, в свою очередь, вместе с микробными токсинами (экзо- и эндотоксины) и различными факторами патогенности микроорганизмов (патогенных, условно-патогенных, непатогенных) выступают в качестве источников эндотоксинемии [9]. Совокупность описанных нарушений лежит в основе развития синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ).

Алкоголь приводит к избыточному бактериальному росту и способен существенно изменить количественный и качественный состав микробиоты кишечника [10]. J.C. Vode и соавт. показали, что почти у половины больных алкоголизмом в аспирате тощей кишки обнаружено увеличение общего числа бактерий с преобладанием анаэробных микроорганизмов [11; 12]. Этанол является одновременно источником энергии и сильным фармакологическим агентом. Первичное поражение систем детоксикации в результате непосредственного влияния этанола, а также их вторичное поражение токсическими продуктами извращенного метаболизма приводят к изменению гомеостаза [9]. В результате происходит взаимное усиление процессов, приводящих к ЭИ.

Анализ приблизительно 78 млн базовых пар последовательностей ДНК из фекальных образцов здоровых взрослых людей показал, что кишечный микробиом активно участвует в метаболизме глицинов, аминокислот, ксенобиотиков [13]. Метаболический ответ организма на эндотоксемию заключается в индукции ферментов, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков. Окисление происходит за счет микросомальных оксидаз смешанного действия при участии НАДФ, кислорода и цитохрома P450 [14, с. 119]. Система цитохрома P450 участвует в нейтрализации многочисленных соединений как экзогенного, так и эндогенного характера. Его индукторы: глюкокортикоиды, фенолы, индолы – участвуют в биотрансформации большого числа лекарственных веществ. Одна из самых распространенных реакций окисления ксенобиотиков цитохромом P450 – окислительное деалкилирование, сопровождающееся окислением алкильной группы, присоединенной к атомам N, O или S [15]. Этот процесс происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) гепатоцитов.

Индукция ферментов, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков, может приводить к снижению эффективности лекарственной терапии, поэтому оценка вклада эндогенной интоксикации, возникающей при дисбиотических процессах на фоне хронического употребления алкоголя, является важной задачей клинической фармакологии.

#### Цель исследования

Изучить взаимосвязь дисбиотических процессов и особенностей биотрансформации ивабрадина, субстрата изофермента CYP3A4, при хронической алкоголизации крыс.

#### Методика исследования

Клинико-лабораторные исследования выполнялись в Волгоградском государственном медицинском университете на базе лаборатории геномных и протеомных исследований Волгоградского медицинского научного центра. Исследование влияния хронической алкоголизации на дисбиотические процессы и систему цитохрома P450 печени проведены *in vitro* и на экспериментальных животных. Работа выполнена на 30 крысах-самцах стока Wistar (280–350 г.), содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ, в НИИ фармакологии ВолГМУ.

Животные были распределены на 2 группы: контрольную, содержащуюся на стандартном водно-пищевом рационе, и экспериментальную, с 15% этанолом как единственным источником жидкости на протяжении 40 суток [16; 17].

Оценка микробиологического статуса кишечника крыс производилась до начала эксперимента (по истечении срока карантина) и на 40-е сутки [18]. Кишечная микробиота оценивалась методом бактериологического посева по стандартным методикам. В качестве объектов микробиологического исследования были выбраны *Bifidobacterium* spp., *Lactobacterium* spp., *Escherichia coli*.

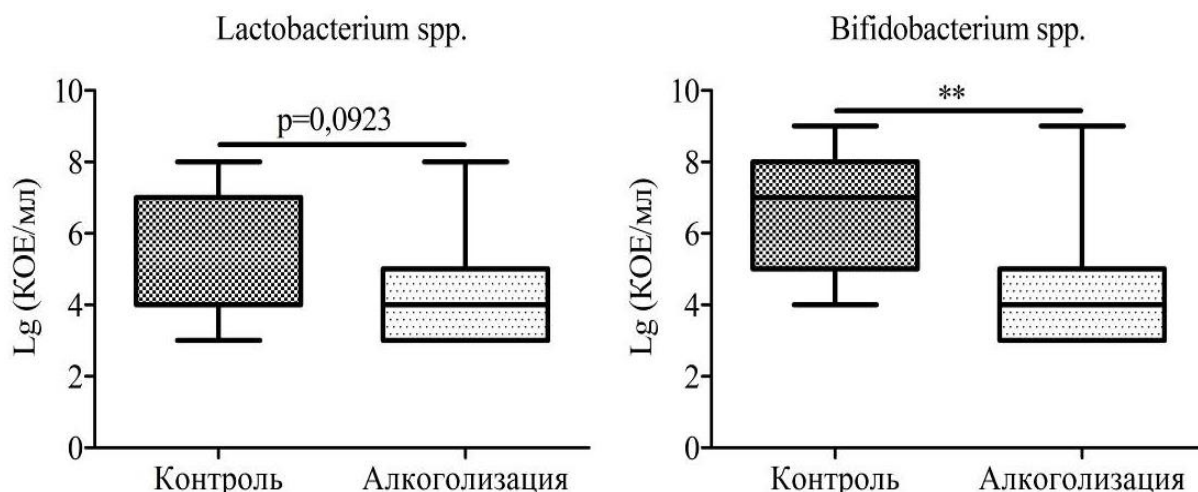
Изучение активности изофермента CYP3A4 производили с использованием в качестве маркерной субстанции ивабрадина, вводимого крысам при помощи интрагастрального зонда (5 мг/кг) на 40-е сутки эксперимента. После введения ивабрадина животных помещали на 6 ч. в метаболические камеры для сбора мочи. Активность CYP3A4 оценивали путем определения метаболического соотношения N-десметиливабрадин/ивабрадин в моче [19; 20] при помощи хроматографической системы высокого давления Agilent 1260 и гибридной масс-спектрометрической системы Sciex QTRAP 5500 на базе tandemного масс-анализатора типа тройной квадруполь.

Статистическая обработка полученных результатов производилась с помощью программ MS Excel (Microsoft, США), GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Параметры распределения оценивали по критериям Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка; сравнение групп производили при помощи t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении) и U-критерия Манна-Уитни (распределение, отличающееся от нормального). Корреляционный анализ проводили с использованием рангового критерия Спирмена.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования обнаружены дисбиотические нарушения в составе кишечной микробиоты у крыс, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации, сопровождающиеся снижением количества представителей пробиотических штаммов.

Анализ результатов микробиологического исследования у животных экспериментальной группы выявил сокращение сахаролитических бактерий – *Lactobacterium* spp., *Bifidobacterium* spp. на 2–4 порядка (рис. 1).

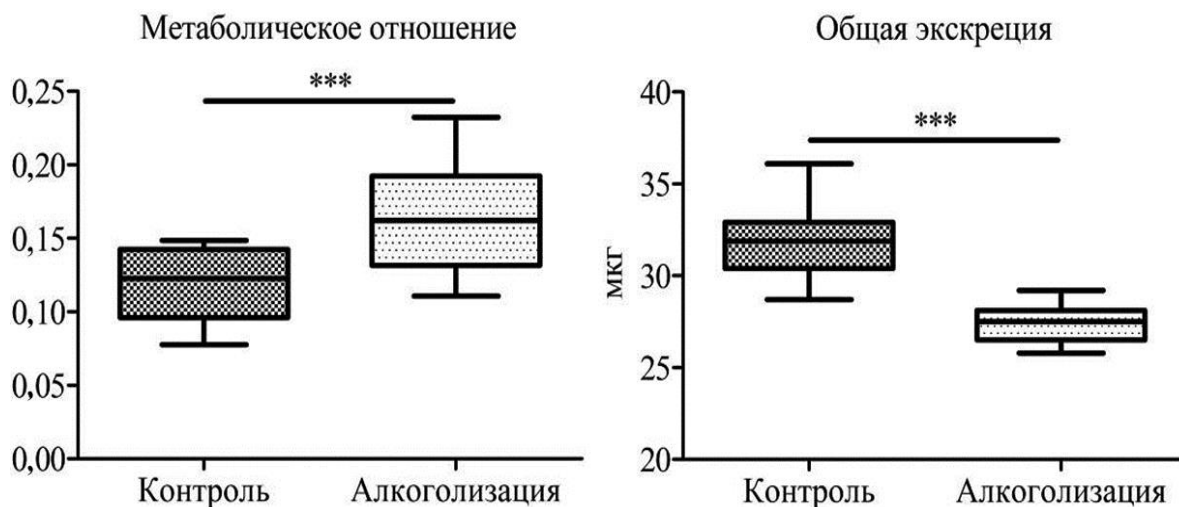


**Рисунок 1** – Состояние сахаролитической микробиоты кишечника крыс после алкоголизации.

Примечание:  $**$  –  $p<0,01$  (U-критерий Манна-Уитни)

Изменения в составе микробиоты сопровождались статистически значимым увеличением метаболического отношения N-десметиливабрадин/ивабрадин в моче крыс и достоверным снижением общей экскреции данных соединений ( $p<0,001$ ; см. рис. 2). Повышение метаболического отношения может быть связано с индуцирующим действием алкоголя на различные ферментативные системы организма,

включающие цитоплазматические оксидазы, микросомальные оксигеназы и ряд изоферментов системы цитохрома P450, в том числе и CYP3A4, субстратом которого является ивабрадин. В то же время, наблюдаемое снижение общей экскреции ивабрадина и его метаболита свидетельствует о снижении скорости всасывания ивабрадина в желудочно-кишечном тракте.



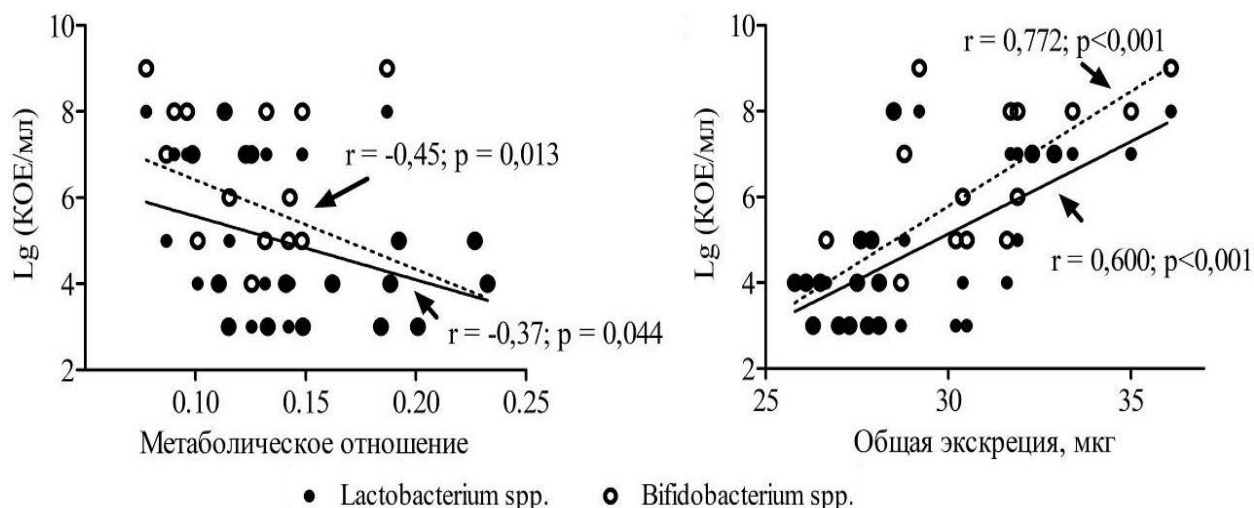
**Рисунок 2** – Метаболическое соотношение N-десметиливабрадин/ивабрадин и их общая экскреция.

Примечание:  $***$  –  $p<0,05$  (t-критерий Стьюдента)

Показатели, характеризующие метаболизм ивабрадина, и состояние микробиоты кишечника крыс коррелировали между собой (см. рис. 3): метаболическое отношение находилось в обратной, а общая экскреция – в прямой корреляционной взаимосвязи с содержанием бифидо- и лактобактерий, что указывает на возможное влияние микробиоты на фармакокинетические показатели ивабрадина. Таким образом, экспериментальная алкоголизация оказала значительное влияние на состояние кишечной микробиоты и, как возможное следствие, на метаболизм ивабрадина – субстрата CYP3A4, что может требовать в клинической ситуации более пристального внимания врача к назначаемым препаратам. Однако для оценки клинической значимости подобных взаимодействий необходимы дальнейшие исследования.

#### Заключение

В ходе работы было обнаружено, что хроническая алкогольная интоксикация в эксперименте сопровождается сокращением количества представителей пробиотических штаммов (бифидобактерии, лактобактерии). При использовании ивабрадина в качестве маркерного субстрата для фенотипирования активности CYP3A4 в группе животных, подвергнутых алкоголизации, было обнаружено увеличение метаболического отношения и снижение общей экскреции ивабрадина и его метаболита с мочой, коррелировавшие с содержанием лактобактерий и биофилобактерий. Обнаруженные изменения указывают на участие кишечной микробиоты в метаболизме ивабрадина и, возможно, иных лекарственных веществ – субстратов CYP3A4, вводимых энтеральным путем.



**Рисунок 3** – Корреляция показателей метаболизма ивабрадина и состоянием сахаролитической микробиоты.  
*Примечание:* показаны коэффициенты корреляции и уровень значимости по ранговому критерию Спирмена, сплошная линия – результаты линейной регрессии для лактобактерий, пунктирная – для бифидобактерий

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. 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. S. 73–79.
2. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism // *J. Nutr* 2007. Vol. 137 (1 Suppl). P. 259–266.
3. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M. et al. The human microbiome project // *Nature*. 2007. Vol. 449 (7164). P. 804–810.
4. Пауков В.С., Угрюмов А.И., Беляева Н.Ю. Межорганные отношения при алкогольной интоксикации // *Архив патологии*. 1991. Т. 53, № 3. С. 3–10.
5. Jenkins D.J.A., Kendall C.W.C., Vuksan V. Inulin, Oligofructose and Intestinal Function // *J. Nutr*. 1999. Vol. 129. P. 1431–1433.
6. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А. Роль микрофлоры кишечника, состава пищи, GPR41 и GPR43 рецепторов к короткоцепочечным жирным кислотам в энергетическом обмене позвоночных животных // *Успехи физиологических наук*. 2017. Т. 48, № 2. С. 141–153.
7. Хавкин А.И. Микрофлора пищеварительного тракта. М.: Фонд социальной педиатрии, 2006. 416 с.
8. Кнышова Л.П., Яковлев А.Т., Морковин Е.И., Доценко А.М. Динамика микробиологических показателей и провоспалительных интерлейкинов при моделировании хронической алкогольной интоксикации у крыс // *Врач-аспирант*. 2017. Т. 84, № 5. С. 69–75.
9. Кнышова Л.П., Яковлев А.Т. Роль эндогенной интоксикации в нарушении гомеостаза организма человека при алкогольной интоксикации // *Наука в современном информационном обществе: мат-лы IX междунар. науч.-практ. конф.* М.: НИЦ «Академический», 2016. С. 31–33.
10. Кнышова Л.П., Яковлев А.Т., Ларионов С.С. Экзо- и эндогенные этиологические факторы нарушения микробиоценоза // *Современные инновации*. 2016. № 5 (7). С. 53–57.
11. 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.
12. Paiva S.A.R., Sepe T.E., Booth S.L., Camilo M.E., O'Brien M.E., Davidson K.W., Sadowski J.A., Russell R.M. Interaction between vitamin K nutriture and bacterial overgrowth in hypochlorhydria induced by omeprazole // *Am. J. Clin. Nutr*. 1998. Vol. 68. P. 699–704.
13. Gill S.R., Pop M., DeBoy R.T. et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome // *Science*. 2 June 2006. Vol. 312. P. 1355–1359.
14. Куценко С.А. Основы токсикологии. М.: Фолиант, 2004. 570 с.
15. Черняк Ю.И., Колесников С.И., Черняк Е.В. Цитохром P450: основные представления, методы исследования, значение для практической медицины: учеб.-метод. пособие. 2-е изд., испр. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2014. С. 47.
16. Кнышова Л.П., Поройский С.В., Яковлев А.Т., Морковин Е.И., Тарасов А.С. Критерии достоверности воспроизведения экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации // *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2016. № 4 (52). С. 48–52.
17. Кнышова Л.П., Поройский С.В., Яковлев А.Т., Морковин Е.И. Влияние экспериментальной хронической эндогенной алкогольной интоксикации на микрофлору кишечника // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2016. № 4 (60). С. 40–44.
18. Даштемирова Д.Х., Яковлев А.Т., Кнышова Л.П. Влияние хронической алкогольной интоксикации на состояние микрофлоры кишечника в эксперименте // *Современные тенденции в науке и образовании: сб. материалов XVIII междунар. науч.-практ. конф.* 2017. С. 303–304.
19. Петров В.И., Магницкая О.В., Толкачев Б.Е. и др. Определение метаболического отношения N-деметиливабрадин/ивабрадин для оценки активности CYP3A4 // *Вестник ВолгГМУ*. 2013. № 3 (47). С. 30–32.
20. Петров В.И., Магницкая О.В., Толкачев Б.Е. и др. Сравнительная оценка методов определения метаболического коэффициента N-деметиливабрадин/ивабрадин в плазме и моче // *Вестник ВолгГМУ*. 2013. № 3 (47). С. 33–34.

**CHANGES OF INTESTINAL MICROBIOTA AND IVABRADINE BIOTRANSFORMATION  
IN RATS AFTER ALCOHOL INTRODUCTION**

© 2017

**Tolkachev Boris Evgenyevich**, candidate of medical sciences,  
associate professor of Fundamental Medicine and Biology Department  
*Volgograd State Medical University (Volgograd, Russian Federation)*

**Morkovin Evgeny Igorevich**, candidate of medical sciences, associate professor of Fundamental  
Medicine and Biology Department; senior researcher of Genomic and Proteomic Researches Laboratory

**Knyshova Liliya Petrovna**, postgraduate student of Clinical Laboratory Diagnostics Department;  
junior researcher of Genomic and Proteomic Researches Laboratory  
*Volgograd State Medical University (Volgograd, Russian Federation);  
Volgograd Medical Research Center (Volgograd, Russian Federation)*

**Yakovlev Anatoly Trofimovich**, doctor of medical sciences, professor,  
head of Clinical Laboratory Diagnostics Department  
*Volgograd State Medical University (Volgograd, Russian Federation)*

**Strygin Andrey Valeryevich**, candidate of medical sciences, head of Fundamental Medicine and Biology  
Department; head of Genomic and Proteomic Researches Laboratory  
*Volgograd State Medical University (Volgograd, Russian Federation);  
Volgograd Medical Research Center (Volgograd, Russian Federation)*

**Abstract.** The role of intestinal microbiota in progress of many pathological processes is discussed in recent publications. It was shown that the continuous intestinal dysbiosis, including the increased bacterial growth syndrome, affects the digestion and the biotransformation of xenobiotics. Intestinal microbiota provokes metabolic failures leading to severe diseases acting via several mechanisms. Alcohol is found to be a common dysbiotic factor and toxic agent affecting the systems of biotransformation. This study was to estimate the associations between the intestinal microbiota and the biotransformation of ivabradine, CYP3A4 substrate, in rats during the chronic alcohol intake. The study used 30 male Wistar rats divided into two groups – control and experimental, administered 15% ethanol as a sole water supply during 40 days to model the chronic alcohol intake. The decrease of bifido- and lactobacterium spp. found in experimental group correlated with excretion and metabolic ratio of ivabradine metabolite and ivabradine in urine. These findings demonstrate the participation of intestinal microbiota in the metabolism of ivabradine after oral introduction.

**Keywords:** xenobiotics; ivabradine; biotransformation; metabolism; intestinal microbiota; dysbiotic processes; probiotic strains; increased bacterial growth syndrome; microbial toxins; endotoxemia; experimental modeling; alcohol; chronic alcohol intake; liver; CYP3A4.

УДК 574.52

Статья поступила в редакцию 05.06.2017

**ПРЕДСТАВИТЕЛИ РУЧЕЙНИКОВ ПОДОТРЯДА INTEGRIPALPIA  
В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА РЕК ЮЖНОГО УРАЛА**

© 2017

**Чаус Борис Юрьевич**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии  
*Стерлитамакский филиал Башкирского государственного университета  
(г. Стерлитамак, Республика Башкортостан, Российская Федерация)*

**Аннотация.** В статье приводится анализ возможности использования личинок ручейников подотряда Integrupalpia для повышения значимости биоиндикационных исследований в ходе экологического мониторинга рек Южного Урала. Сбор и анализ постоянства видов (в долях единицы) ручейников проводился в районах 17 государственных водопостов, находящихся на реках, протекающих по территории Южного Урала, с 2005 по 2016 годы. В качестве химических характеристик на створах использовались такие показатели, как содержание в речных водах соединений марганца, никеля и железа, нефтепродуктов, фенолов, азота аммонийного, меди, цинка, ХПК, БПК<sub>5</sub>, сульфатов, хлоридов, азота нитритного. В качестве комплексного показателя использовался удельный комбинаторный индекс загрязненности воды. Всего в районах проведения исследований была проанализирована динамика постоянства 7 видов личинок ручейников, относящихся к подотряду Integrupalpia. Впервые составлен список постоянных, добавочных и случайных видов Integrupalpia на изученных участках рек Южного Урала. Выявлены статистически значимые корреляционные зависимости между постоянством личинок видов ручейников с рядом гидрохимических показателей. Построены регрессионные модели для прогноза постоянства личинок видов подотряда Integrupalpia в зависимости от концентрации загрязнителей, содержащихся в речных водах. Сочетание динамики постоянства личинок видов ручейников подотряда Integrupalpia с результатами гидрохимических анализов позволит выявить наиболее сильно действующие на гидробионтов загрязняющие химические вещества, входящие в состав сточных вод, сбрасываемых в поверхностные воды Южного Урала.

**Ключевые слова:** биоиндикация; ручейники; личинки ручейников; подотряд Integrupalpia; Южный Урал; постоянство видов; динамика постоянства; гидрохимические показатели; загрязнители; удельный комбинаторный индекс загрязненности воды; корреляционные модели; регрессионные модели.