

УДК 616.8-009

Влияние фармакологической модели нарушения кишечной микробиоты на поведенческие реакции крыс

Кулагина Ю.О., Беляков В.И.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»
443086, Самара, ул. Московское шоссе, д. 34

Цель исследования заключалась в изучении влияния антибиотик-индуцированной модели нарушения кишечной микробиоты на поведенческие реакции взрослых крыс в различных тестовых установках.

Материалы и методы. Исследование выполнено на взрослых крысах-самцах линии Wistar с соблюдением норм биоэтики. Крысам экспериментальной группы ($n = 6$) ежедневно в течение 10 суток *per os* вводилась комплексная суспензия (смесь) различных антибиотиков (ванкомицин 0,5 г/кг; метронидазол 0,5 г/кг; ампициллин 0,5 г/кг). Крысы контрольной группы ($n = 6$) по аналогичной схеме получали стерильную воду. Видовой и количественный анализ кишечной микробиоты проводился с использованием методов посева фекальной массы, световой микроскопии и масс-спектрометрии. Поведенческие реакции изучались при помощи различных тестов (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, лабиринт Барнс). Состав кишечной микробиоты, поведенческие реакции анализировались в исходном состоянии и через 10 суток после введения веществ. Результаты исследования обрабатывались при помощи статической программы SigmaStat 12.5. Статистически значимыми результаты считались при $p < 0,05$.

Результаты. Действие комплекса антибиотиков приводило к значимому истощению и изменению состава микробной флоры кишечника у крыс, о чём свидетельствовали результаты микроскопического анализа посевного материала и данные масс-спектрометрии. Отмечалось снижение числа лактобактерий, микрококков, энтерококков и кишечных палочек. В посевах наблюдалось преобладание *S. maltophilia*. Фармакологическая модель нарушения кишечной микробиоты приводила к изменениям поведенческих реакций крыс в различных тестах. В открытом поле под влиянием комплекса антибиотиков происходило снижение исследовательской активности. Воздействие антибиотиков усиливало уровень тревожности, о чём свидетельствовало уменьшение времени нахождения крыс в открытых рукавах крестообразного лабиринта. В лабиринте Барнс введение комплекса антибиотиков оказывало отрицательное влияние на пространственную память крыс.

Заключение. Воздействие коктейля антибактериальных препаратов вызывает нарушение кишечной микробиоты у крыс, ассоциированное со снижением ориентировочно-исследовательской активности и функции пространственной памяти на фоне повышенной тревожности.

Ключевые слова: кишечная микробиота; антибиотики; поведение; исследовательская активность; тревожность; память; крысы.

Для цитирования: Кулагина Ю.О., Беляков В.И. Влияние фармакологической модели нарушения кишечной микробиоты на поведенческие реакции крыс. Патогенез. 2024; 22(2): 55-58.

DOI: 10.25557/2310-0435.2024.02.55-58

Для корреспонденции: Кулагина Юлия Олеговна, e-mail: kulagina.yulia.sam@gmail.com

Финансирование: Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 07.06.2024.

The effect of the pharmacological model of intestinal microbiota disorders on the behavioral reactions of rats

Kulagina Yu.O., Belyakov V.I.

Samara National Research University
Moskovskoye shosse 34, Samara 443086, Russian Federation

The aim of the study was to study the effect of the pharmacological model of intestinal microbiota disorders on the behavioral reactions of adult rats in various test facilities

Materials and methods. The study was performed on adult male rats of the Wistar line in compliance with the norms of bioethics. Rats of the experimental group ($n = 6$) daily for 10 days A complex suspension of various antibiotics was administered *per os* day (vancomycin, 0.5 g/kg; metronidazole 0.5 g/kg; ampicillin, 0.5 g/kg). The rats of the control group ($n = 6$) received sterile water according to a similar scheme. The specific and quantitative analysis of the intestinal microbiota was carried out using methods of fecal mass seeding, light microscopy and mass- spectrometry. Behavioral reactions were studied using various tests (open field, raised cruciform maze, Barnes maze). The specific and quantitative composition of the intestinal microbiota, behavioral reactions were analyzed in the initial state and 10 days after administration of the substances. The results of the study were processed using the static program SigmaStat 12.5. Statistically significant results were considered at $p < 0.05$.

Results. The action of the antibiotic complex led to significant depletion and a change in the composition of obligate intestinal microbes in rats, as evidenced by the results microscopic analysis of the seed material and mass spectrometry data. In particular, there was a decrease in the number of lactobacilli, micrococci, enterococci and *E. coli*. The predominance of *S. maltophilia* was observed in the crops. The pharmacological model of intestinal microbiota disorders led to changes in the behavioral reactions of rats in various tests. In the open However, under the influence of the antibiotic complex, there was a decrease in research activity. Exposure to antibiotics increased the level of anxiety, as evidenced by a decrease in the time spent by rats in the open arms of the cruciform maze. In the Barnes maze, the administration of a complex of antibiotics had a negative effect on the spatial memory of rats.

Conclusion. *Exposure to a cocktail of antibacterial drugs causes a violation of the intestinal microbiota in rats, associated with a progressive decrease in research activity and spatial memory function against the background of increased anxiety.*

Key words: *intestinal microbiota; antibiotics; behavior; exploratory activity; anxiety; memory; rats.*

For citation: Kulagina Yu.O., Belyakov V.I. [The effect of the pharmacological model of intestinal microbiota disorders on the behavioral reactions of rats]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2024; 22(2): 55-58. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2024.02.55-58

For correspondence: Kulagina Yulia Olegovna, e-mail: kulagina.yulia.sam@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 07.06.2024.

Введение

В настоящее время возрос интерес к изучению роли оси «микробиота кишечника — мозг» в патогенезе неврологических заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, депрессия, шизофрения и др.), поскольку у пациентов с данными расстройствами распространены дисбиоз кишечной микрофлоры и нарушения функциональной активности кишечника [1, 2]. В экспериментальных исследованиях убедительно показана зависимость протекания нервных процессов, активности нейротрансмиттерных систем, состояния глиального компонента нервной ткани от состава микробиоты кишечника. В опытах на «безмикробных» животных также продемонстрирована особая значимость кишечной микробиоты для нормального функционирования мозга.

Согласно современным представлениям, кишечные бактерии являются источником различных биологически активных веществ, способных проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать модулирующее влияние на структуры мозга и синаптическую нейротрансдукцию [3, 4]. В настоящее время остро стоит проблема неоправданно масштабного применения антибактериальных препаратов, способных нарушать состояние баланса на уровне кишечной микробиоты. Вместе с тем, введение антибиотиков, действующих на уровне кишечника, является адекватной моделью для дальнейшего изучения проблемы взаимоотношений кишечной микробиоты и мозга. Одним из мало изученных аспектов данной проблемы является влияние нарушений кишечной микробиоты на организацию процессов высшей нервной деятельности и поведение.

Цель исследования: изучить влияние антибиотик-индуцированной модели нарушения кишечной микробиоты на поведенческие реакции взрослых крыс.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 12 крысах-самцах линии Wistar с массой 230 ± 15 г. с соблюдением норм биоэтического отношения к лабораторным животным. Протокол эксперимента утвержден на заседании комиссии по биоэтике Самарского университета. Животные рандомно были разделены на две группы. В экспериментальной группе ($n = 6$) фармакологическая модель нарушения

кишечной микробиоты воспроизводилась введением *per os* комплексной суспензии антибактериальных препаратов объемом 0,5 мл (ванкомицин, 0,5 г/кг; метронидазол 0,5 г/кг; ампициллин, 0,5 г/кг). Крысы контрольной группы ($n = 6$) по аналогичной схеме получали стерильную воду. Введение веществ крысам обеих групп производилось ежедневно в течение 10 суток в утреннее время.

Для оценки поведенческого статуса использовались различные поведенческие установки (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, лабиринт Барнс). В открытом поле методом видеонаблюдения регистрировались горизонтальная и вертикальная двигательная активность, исследовательское поведение. В приподнятом крестообразном лабиринте оценивалось время нахождения крыс в открытых и закрытых рукавах. Увеличение времени нахождения в закрытых рукавах теста расценивалось как повышение уровня тревожности. В лабиринте Барнс по времени нахождения истинного убежища изучали особенности кратковременной пространственной памяти. Тестирование крыс контрольной и экспериментальной групп в лабиринте Барнс производилось три раза. При этом фиксировалось время нахождения убежища при первой, при второй и третьей подсадках. Поведенческое фенотипирование осуществлялось в исходном состоянии и через 10 суток после введения исследуемых веществ.

Состав микробиоты кишечника изучался при помощи метода посева фекальной массы (разведение в стерильном физиологическом растворе — 10^{-7} раз) на питательные среды (МПА, висмут-сульфит агаре, агар Сабуро и Бифидум-среду). Забор фекальных болюсов производился в исходном состоянии и через 10 суток после введения веществ. Методами световой микроскопии (Биомед-2) и масс-спектрометрии (Microflex) определялся видовой состав кишечной микробиоты. Кроме того, производился подсчет каждой видовой группы микроорганизмов в 0,5 г фекальных болюсов.

Результаты исследования обрабатывались при помощи статической программы SigmaStat 12.5. Статистически значимым считалось $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В исследовании установлено, что комплексное воздействие антибиотиков приводило к значимым изменениям в состоянии кишечной микробиоты и поведен-

ческих реакций в различных тестовых установках. Так, воздействие в течение 10 суток экспериментальной смеси из трех антибиотиков приводило к снижению обследований отверстий в арене открытого поля в среднем на 23% ($p < 0,05$). Установленное изменение свидетельствует о возникновении дефицита ориентировочно-исследовательской активности крыс. Данный поведенческий показатель у крыс экспериментальной группы был на 31% ($p < 0,05$) ниже, чем у крыс контрольной группы (рис. 1).

В установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» время нахождения крыс в открытых рукавах в среднем уменьшилось на 30% ($p < 0,05$). Число пересеченных секторов в открытых рукавах к концу наблюдения у крыс, получавших антибиотики, оказалось на 27% ниже ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными особями. Отмеченный паттерн поведения может быть связан с повышенным уровнем тревожности у крыс экспериментальной группы. Крысы из контрольной группы, напротив, к концу наблюдения повышали уровень двигательной активности в открытых рукавах данного теста. Отмеченные особенности поведенческих реакций крыс в приподнятом крестообразном лабиринте представлены на рис. 2.

В лабиринте Барнс время нахождения истинного убежища закономерно снижалось только у крыс контрольной группы. В частности, время нахождения истинного убежища при третьем предъявлении тестового задания было на 24% меньше ($p < 0,05$), чем время поиска при первой подсадке в лабиринт. Время нахождения истинного убежища при первой, второй и третьей подсадках в лабиринт у экспериментальных крыс значимо не отличалось (рис. 3). Такой характер поведения крыс в лабиринте Барнс указывает на отрицательное влияние введения антибиотиков на поисковое поведение и функцию пространственной памяти.

Отмеченные особенности поведенческого паттерна крыс, получавших в течение 10 суток эксперименталь-

ный раствор с тремя действующими на уровне кишечника антибиотиками, могут быть связаны с нарушением баланса на уровне кишечной микробиоты и снижением секреции нейротропных веществ.

Данное заключение подтверждается результатами микроскопического анализа и масс-спектрометрии. На рис. 4 отмечено уменьшение числа колоний кишечных микроорганизмов у крыс под влиянием воздействия антибиотиков. Установлено, что под влиянием комплекса антибиотиков происходило значимое снижение численности колоний *E. Coli* на 22% ($p < 0,05$) и *Micrococcus luteus* на 71% ($p < 0,01$).

Снижение выработки в этих условиях короткоцепочных жирных кислот, биогенных аминов и др. веществ с нейромодуляторными эффектами может приводить к дефициту когнитивных функций, нарушениям

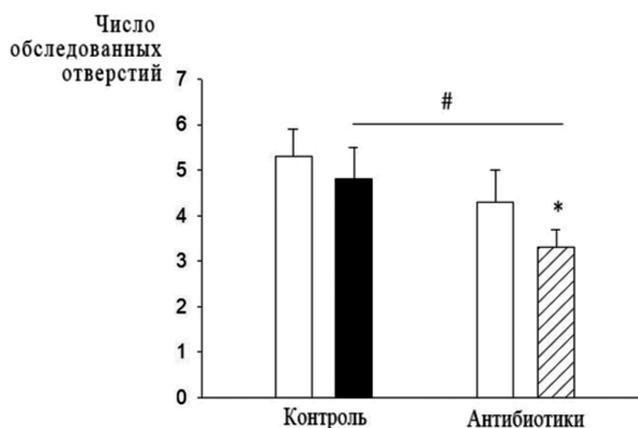


Рис. 1. Влияние антибиотиков на число обследованных отверстий в открытом поле. Обозначения: белые столбики – исходный уровень, чёрный столбик – через 10 суток после введения физиологического раствора, столбик со штриховкой – через 10 суток после введения антибиотиков, * – отличие в сравнении с исходным уровнем при $p < 0,05$, # – отличие между группами при $p < 0,05$.

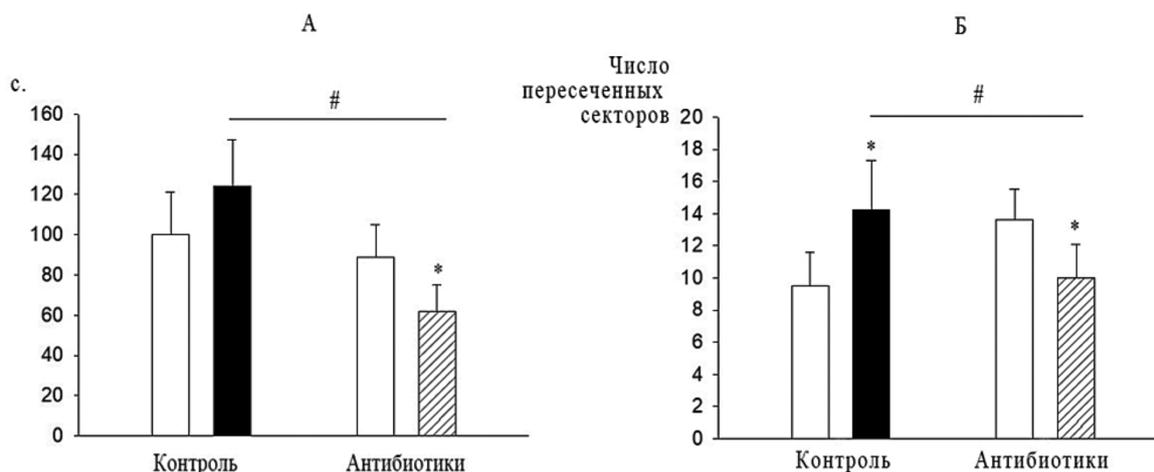


Рис. 2. Влияние антибиотиков на время нахождения крыс (А) и число пересеченных секторов (Б) в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта. Обозначения: белые столбики – исходный уровень, чёрный столбик – через 10 суток после введения физиологического раствора, столбик со штриховкой – через 10 суток после введения антибиотиков, * – отличие в сравнении с исходным уровнем при $p < 0,05$, # – отличие между группами при $p < 0,05$.

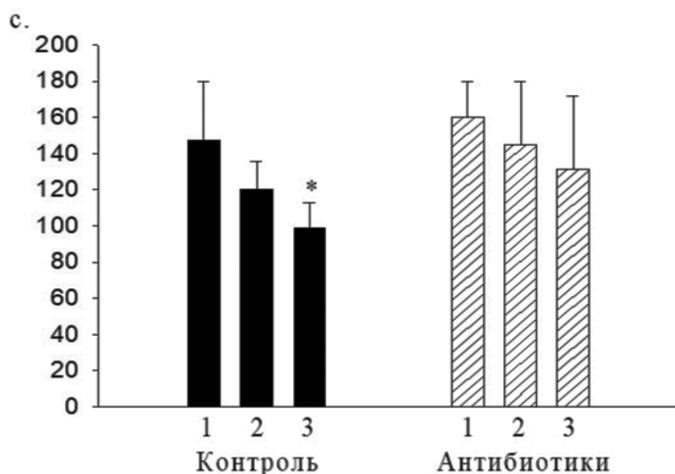


Рис. 3. Влияние антибиотиков на время нахождения истинного убежища в лабиринте Барнс. Обозначения: чёрные столбики – поведение через 10 суток после введения физиологического раствора, столбики со штриховкой – через 10 суток после введения антибиотиков, 1 – время нахождения истинного убежища при первой подсадке, 2 – при второй подсадке, 3 – при третьей подсадке, * – отличие в сравнении с тестированием при первой подсадке при $p < 0,05$.

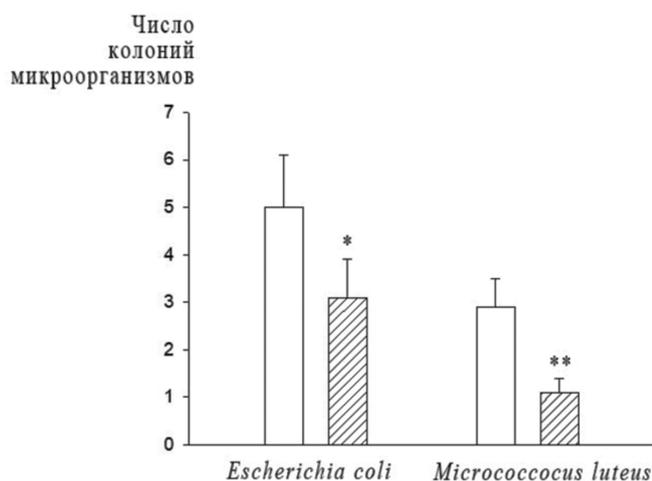


Рис. 4. Влияние антибиотиков на кишечную микробиоту крыс. Обозначения: белые столбики – исходный уровень, столбики со штриховкой – через 10 суток после введения антибиотиков, * – отличие в сравнении с исходным уровнем при $p < 0,05$, ** – отличие в сравнении с исходным уровнем при $p < 0,01$.

Сведения об авторах:

Кулагина Юлия Олеговна — бакалавр кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»; <https://orcid.org/0009-0006-0586-7035>

Беляков Владимир Иванович — кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»; <https://orcid.org/0000-0002-4317-4890>

эмоционального статуса и, как следствие, формированию дезадаптивного поведения.

Заключение

Таким образом, использованная в исследовании антибиотик-индуцированная модель нарушения кишечной микробиоты приводит к значимым изменениям микробного состава кишечника и формированию особого паттерна поведения с низким уровнем исследовательской активности, повышенной тревожностью и дефицитом пространственной памяти.

Авторский вклад

Кулагина Ю.О. — выполнение экспериментальной части исследования, обработка экспериментальных данных, обсуждение результатов исследования, анализ источников литературы; Беляков В.И. — формулирование цели и задач исследования, подбор и обоснование методов исследования, подготовка иллюстративного материала, оформление заключения.

Список литературы

1. Рылова Н.В., Жолинский А.В., Самойлов А.С. Роль микробиоты кишечника в поддержании гомеостаза организма. *Современные проблемы науки и образования*. 2019; 6: 204.
2. Góralczyk-Bińkowska A, Szmajda-Krygier D, Kozłowska E. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Psychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(19): 11245. DOI: 10.3390/ijms231911245
3. Qigley E.M.M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017; 17(12): 94. DOI: 10.1007/s11910-017-0802-6
4. Харитонов Л.А., Григорьев К.И., Борзакова С.Н. Микробиота человека: как новая научная парадигма меняет медицинскую практику. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019; 1(161): 55–63. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-161-1-55-63

References

1. Rylova N.V., Zholinsky A.V., Samoilov A.S. [The role of the intestinal microbiota in maintaining the body's homeostasis]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern Problems of Science and Education]. 2019; 6: 204. (in Russian)
2. Góralczyk-Bińkowska A, Szmajda-Krygier D, Kozłowska E. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Psychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(19): 11245. DOI: 10.3390/ijms231911245
3. Qigley E.M.M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017; 17(12): 94. DOI: 10.1007/s11910-017-0802-6
4. Kharitonova L.A., Grigoriev K.I., Borzakova S.N. [Human microbiota: how a new scientific paradigm is changing medical practice]. *Ekspierimental'naia i klinicheskaia gastroenterologija* [Experimental and Clinical Gastroenterology]. 2019; 1(161): 55–63. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-161-1-55-63. (in Russian)