
взаимодействия бактерий. В пользу этого предположения свидетельствуют разрушение цитоплазматических мембран эритроцитов и появление в них пузырьков с зазубренными краями.

Возможно, взаимодействие бактерий с эритроцитами осуществляется посредством факторов патогенности. Особое место в ряду факторов патогенности занимают внеклеточно секретируемые молекулы с мембрано-повреждающей способностью, получившие общее название "гемолизины". Микроорганизмы, синтезирующие данные молекулы, обладают гемолитической активностью, в результате чего происходит лизис эритроцитов с последующим освобождением гемоглобина [9].

Для реализации и усиления патогенных свойств микроорганизмам необходимо определенное количество железа, которое они должны утилизировать в организме хозяина при развитии инфекционного процесса. Сорбируя из среды железо, бактерии приобретают способность лучше противостоять неблагоприятным факторам, а также получают преимущества в конкурентной борьбе [10].

Литература

1. *Ahazamora R., O' Mahony F., Hervey B. Y.*, Sterolid, 2011, 76, P.861-876.
2. *Бондаренко В. М., Рябченко Е. В.*, ЖМЭИ, 2013, N 2, С. 112-120.
3. *Willis C. L., Toxicol. Pathol.*, 2011, 39(1), P. 172-185
4. *Поздеев О. К., Покровский В.И.* "Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями". М. 1984.
5. *Брюзова В. И., Боровягин В.А. и др.*- Электронно-микроскопические методы исследования биологических объектов. М. Изд-во АН СССР. 1963.
6. *Vacsoti G., Villanacci V.*, Gastroenterology, 2007, 18(30), P. 4035-4041
7. *Бондаренко В. М., Рябченко Е. В.*, ЖМЭИ, 2011, N6, С. 101-106.
8. *Мавзютов А.Р., Бондаренко В. М.* – ЖМЭИ. 2007. N1, С. 89-97
9. *Бухарин О. В., Стадников А. А., Усвятцов Б. Я.* – ЖМЭИ. 2006. N4 С. 25 -28.
10. *Будихина А. С., Михайлова Н. А., Биткова Е. Е., Хватов В. Б.* – ЖМЭИ. 2007. N2, С. 53-57.

Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

УДК 577.152.353:615.214

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ КОКТЕЙЛЯ СЕЛЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ПРОБИОТИКОВ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СДВИГИ В ДИНАМИКЕ ДЕКСАМФЕТАМИН-ИНДУЦИРОВАННОГО БИПОЛЯРНОГО РАССТРОЙСТВА.

**Н.Х. АЛЧУДЖЯН, А.А. АГАБАБОВА, Н.О. МОВСЕСЯН,
М.Р. ОГАННИСЯН, А.М. АКОПЯН, О.А. МОВСЕСЯН, Г.А. ГЕВОРКЯН**

*Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА,
alchujyan@mail.ru*

Впервые при экспериментальном биполярном расстройстве (БР) показано терапевтическое действие смеси селективных штаммов пробиотиков, обладающих нейроактивным, антигрибковым и иммуностимулирующим воздействием. Их предварительное введение крысам в течение 2 недель до инъекций дексамфетамина (АМРН) и далее 24 дня параллельно с ним, восстанавливало микробиоту и поведенческие характеристики, подавляло процессы перекисного окисления липидов и снижало субклеточную активность изоформ аргиназы, в

отделах кортиколимбической системы, в течение 21 дня после АМРН-индуцированного БР.

Аргиназа, биполярное расстройство, дексамфетамин, кортиколимбическая система, митохондрии, перекисное окисление липидов, пробиотики, цитоплазма.

We show for the first time the therapeutic effects of the probiotic selective strains with neuroactive, antifungal and immune-stimulatory activity following experimental bipolar disorder (BD). Administration of this composition 2 weeks before and 24 days parallel with dexamphetamine (AMPH) injections restore microbiota and behavioral characteristics with a concomitant inhibition of both lipid peroxidation processes and arginase intracellular activity in the regions of corticolimbic system for 21 days after AMPH-induced BD

Arginase, bipolar disorder, corticolimbic system, cytoplasm, dexamphetamine, lipid peroxidation, mitochondria, probiotics .

Նյարդային, հակասնկային և իմունկոնստիտուցիոնալ ակտիվությամբ օժտված պրոբիոտիկների խառնուրդի թերապևտիկ ազդեցությունը առաջին անգամ ցուցաբերվել է փորձարարական երկբևեռ խանգարման (ԵԽ) ժամանակ: Նշված խառնուրդի ներմուծումը դեքսամֆետամինի (AMPH) ներարկումներից 2 շաբաթ առաջ և 24 օր AMPH-ին զուգահեռ կարգավորում է կենդանիների միկրոբիոտան և վարքային բնութագիրը ու միաժամանակ երկարատև արգելակում է լիպիդների գերօքսիդացման գործընթացները և արգինազի ներքջային ակտիվությունը գլխուղեղի կեղևալիմբիական համակարգի բաժիններում AMPH-մակածված ԵԽ առաջացումից 21 օր հետո:

Արգինազ, քջապլազմա, դեքսամֆետամին, երկբևեռ խանգարում, լիպիդների գերօքսիդացում, կեղևալիմբիական համակարգ, միտոքոնդրիումներ, պրոբիոտիկներ

Исследования последних лет свидетельствуют о критическом влиянии микробиоты на психическое состояние и поведение хозяина [17]. Сообщалось о нарушениях микробиоты и активировании оппортунистических микробов при биполярных расстройствах (БР) и шизофрении [10]. При экспериментальном БР нами также было выявлено подавление роста облигатной микрофлоры, обильное разрастание *Candida albicans*, и манифестация *Staphylococcus aureus* и гемолитической *E. coli* [2]. Введение селективных штаммов пробиотиков, иммобилизованных на цеолите, препятствовали нарушению когнитивных функций и развитию депрессивоподобного состояния у стрессированных крыс [6]. В данной работе изучено влияние смеси отобранных пробиотиков в кортиколимбической системе в динамике экспериментального БР.

Материал и методы

Моделирование БР. Эксперименты проводили на половозрелых 2- 3-месячных белых крысах-самцах линии Вистар массой 120-150 г, которые ежедневно получали одноразовую внутримышечную инъекцию 0.2 мл *d*-амфетамин сульфата (дексамфетамин, АМРН) (Sigma, St. Louis, Mo.) (2-6 мг/кг массы тела, 18 инъекций) [11, 22]. Животные были разделены на группы по 12 в каждой: контрольная - интактные крысы, и опытные, которых исследовали сразу и через одну, две и три недели после прекращения введения АМРН, крысы, получавшие per os 1 мл смеси пробиотиков (6×10^9 КОЕ/мл) в течение 2 недель до инъекций АМРН, далее параллельно с АМРН и исследуемые в те же сроки.

Штаммы пробиотиков. Коммерчески доступный порошок, содержащий живые бактерии *E. coli* штамм М17, *Lactobacillus salivarius* штамм В-7701, *L. Rhamnosus* штамм ВКПМ В-6778 (VITAMAX-E, LTD Co, Yerevan RA), *L. plantarum* штамм ЦМПМ В-2353, *L. acidophilus* штамм ИНМИА 9602 (РЦДМ), и *Bifidobacterium bifidum* ВКПМ штамм АС-1666, регидратировали до 10^9 КОЕ/мл в стерильном 0,85% NaCl и культивировали в анаэробных условиях при 37°C в MRS среде.

Поведение животных оценивали в тестах “открытое поле” (ОП) и “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) [1, 5, 9].

Забор биологического материала. После тестирования на поведенческую активность, крыс декапитировали, забирали кровь и извлекали структуры мозга. Каждое животное вскрывалось в асептических условиях и образцы кала из нижней части кишки, кровь, полученная после декапитации, и смывы с мозга забирались для идентификации микроорганизмов установленными процедурами [4].

Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракций структур мозга осуществляли методом дифференциального центрифугирования [3]

Активность аргиназы определяли по аргинин-зависимому образованию орнитина (в течение 1 ч при 37 °С) в реакционной смеси: 20 мМ HEPES буфер pH 7.4 содержащем 2 мМ дитиотреитол, 0.05 М $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ и 0.2 М L-аргинин, и выражали в мкмоль L-орнитина / мг белка / ч [15].

Содержание белка определяли методом Лоури [19].

Статистика. Достоверность различий оценивали на основе параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и последующим постдисперсионным анализом Холм-Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5

Результаты и обсуждение

Для имитации БР человека молодым самцам крыс ежедневно в течение 24 дней вводили возрастающие нетоксические дозы АМРН, которые вызывают циклические изменения поведенческих характеристик [21]. С целью воздействия на весь комплекс изменений, выявленных при экспериментальном БР использовали смесь пробиотиков: психобиотики *L. Rhamnosus* и *Bifidobacterium bifidum* [7, 25], обладающие противогрибковым и иммуностимулирующим действием *L. salivarius*, *L. plantarum* и *L. acidophilus*, [13] и *E. coli*, основной конкурент условно-патогенной микрофлоры [14, 18]. Обработка пробиотиками подавляла АМРН-индуцированные маниакальные проявления, нормализовало микробиоту, и препятствовала развитию гистопатологических изменений в отделах кортиколимбической системы мозга, которые при отсутствии лечения наблюдались и по истечении трех недель после прекращения инъекций дексамфетамина [2]. Введение коктейля пробиотиков регион-специфически подавляло процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) сразу по окончании курса инъекций АМРН и в постамфетаминный период (рис. 1).

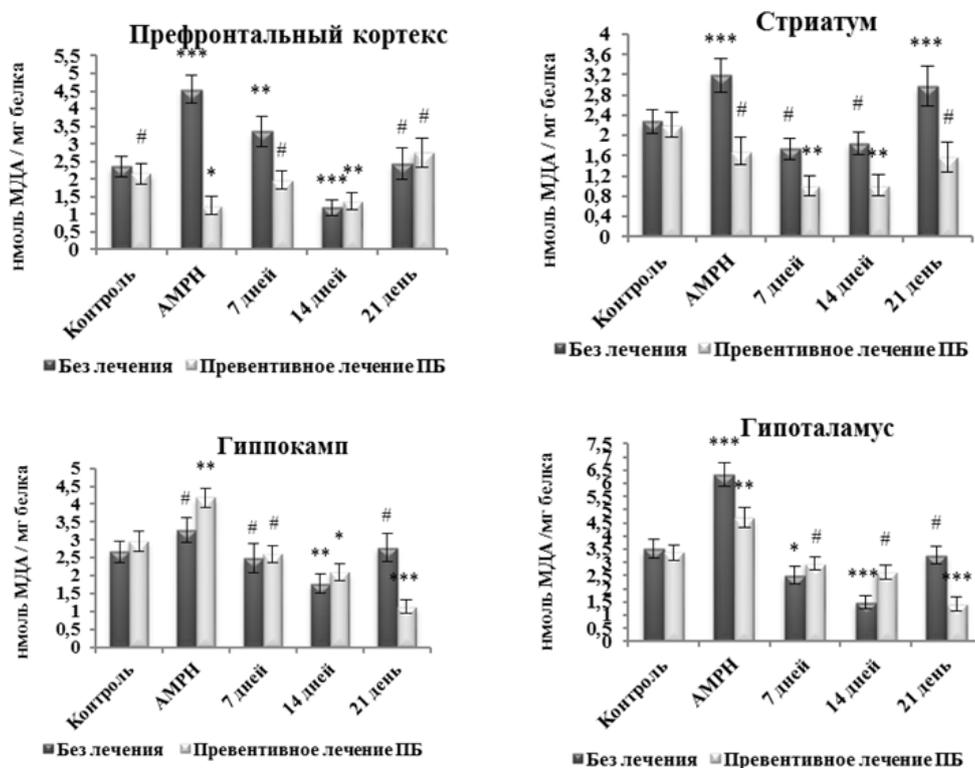


Рис. 1. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на содержание малонового диальдегида (МДА) в отделах кортиколимбической системы в динамике БР. Здесь и далее результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=12$, достоверность (p) различий по сравнению с контролем представлена обозначениями: # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Благотворное действие пробиотиков отчасти обусловлено купированием ими свободнорадикального окисления вовлеченного в этиопатогенез БР [23]. Ингибированием ПОЛ можно объяснить выявленное нами модулирующее влияние пробиотиков на активность цитоплазматического и митохондриального изоферментов аргиназы (АРГ1 и АРГ2, соответственно), которые лимитируют содержание аргинина, расщепляя его на орнитин и мочевину. Отметим, что АРГ1 участвует в путях синтеза из орнитина пролина или глутамата, а АРГ2 направляет метаболизм в сторону синтеза путресцина и далее полиаминов, вовлеченных в механизмы БР и шизофрении [8, 24].

На рис. 2-5 представлена картина динамических изменений аргиназной активности в системе цитоплазма-митохондрии при AMPH-индуцированном БР и впервые показано модулирующее времязависимое влияние превентивного и последовательного лечения коктейлем пробиотиков.

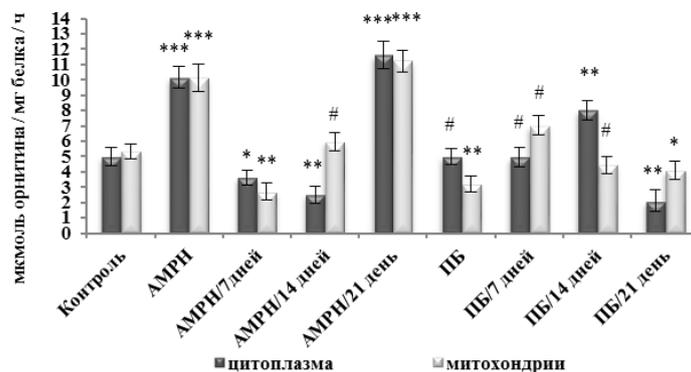


Рис. 2. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы префронтального кортекса при БР.

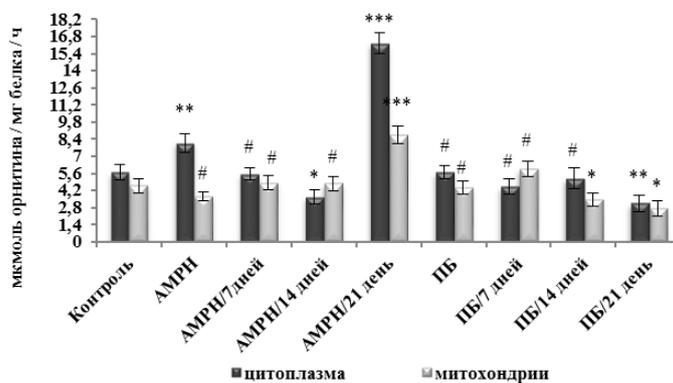


Рис. 3. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы стриатума при БР

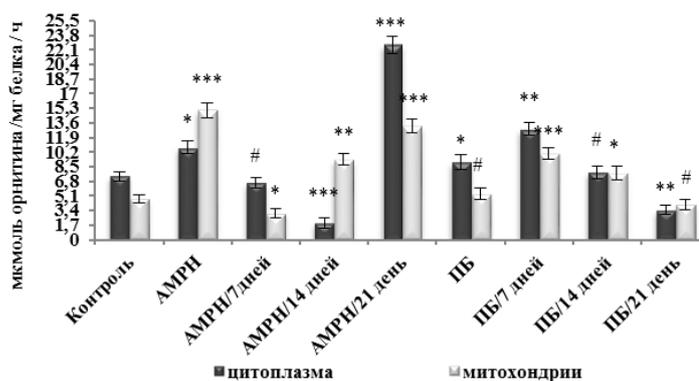


Рис. 4. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы гиппокампа при БР

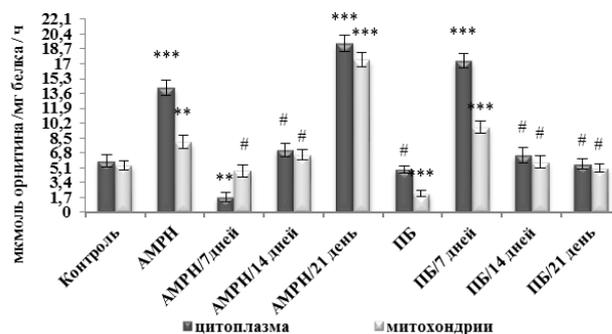


Рис. 5. Влияние композиции пробиотиков (ПБ) на динамику сдвигов субклеточной активности аргиназы гипоталамуса при БР.

Активирование процессов ПОЛ свидетельствует о стимулировании свободно-радикальных процессов с выбросом супероксид-аниона и H_2O_2 , вызывающих повышение содержания мРНК АРГ1 и возрастание ее активности [20]. АРГ1 может также индуцироваться окисленными и ацетилированными липопротеинами [12]. Таким образом, окислительный стресс при БР может являться одной из причин стимулирования аргиназы.

Аргинин оказывает нейропротекторное действие, препятствуя развитию отека мозга (в кортексе, стриатуме и пр.), и подавляя *in vivo* глутамат-индуцированную нейрональную активность (вентро-медиальный гипоталамус) [16]. Не исключено, что нормализация пробиотиками субклеточной активности изоформ аргиназы влияет на содержание аргинина и регулирует гистопатологической картины в структурах мозга, поскольку пробиотики препятствовали образованию отеков, пролиферации и появлению атипичных клеток, которые наблюдались при экспериментальном БР (статья в печати).

Полученные результаты позволяют осмыслить молекулярные механизмы воздействия пробиотиков и открывают перспективу для клинических исследований в целях их использования для профилактики, терапии и предотвращения рецидивов БР.

Литература

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. 1991, 399 с.
2. Геворкян Г.А., Акопян А.М., Мовсесян О.А., Агабабова А.А. Микробиота крыс под воздействием амфетамина. Доклады НАН РА, 2016, т. 116, (3), с. 321-326.
3. Диге Г.П., Ещенко Н.Д., Диге А.А., Красовская И.Е. Введение в технику биохимического эксперимента. СПб., 2003, 86 с.
4. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями. (Покровский В.И. ред.) М., 1984.
5. Augustsson H., Meyerson B. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (*Mus musculus*) and two laboratory strains. *Physiol. Behav.*, 2004, v. 81 (4), p. 685-698.
6. Barseghyan K.A., Sargsyan H.H., Madoyan R.A., Alchujyan N.Kh., Guevorkian A.G., Movsesyan N.H., Hayrapetyan H.L., Hovhannisyan M.R., Khachatryan H.F., Barseghyan V.A., Kevorkian G.A. Combined effect of lactic acid bacteria and modified natural mineral composite substances on the chronic stress-induced depression and cognitive deficit. *J. Applied Biochem. Photon*, 2013, v. 106, p. 157-169.
7. Bravo J.A., Julio-Pieper M., Forsythe P., Kunze W., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor

-
- expression in a mouse via the vagus nerve. *Curr Opin Pharmacol.*, 2012, v. 12 (6), p. 667-672.
8. *Cederbaum S.D., Yu H., Grody W.W., Kern R.M., Yoo P.*, Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol. Genet. Metab.*, 2004, v. 81 (Suppl 1), p. S38-S44.
 9. *Costall B., Nylor R., Olley J.* The substantia nigra and stereotyped behavior. *Eur. J. Pharmacol.*, 1972, v. 18, p. 95-106.
 10. *Dickerson F., Severance E., Yolken R.* The microbiome, immunity, and schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Behav. Immun.*, 2017, v. 62, p. 46-52.
 11. *Frey B.N., Valvassori S.S., Réus G.Z., Martins M.R., Petronilho F.C., Bardini K., Dal-Pizzol F., Kapczinski F., Quevedo J.* Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J. Psychiatry Neurosci.*, 2006, v. 31 (5), p. 326-332.
 12. *Gallardo-Soler A., Gómez-Nieto C., Campo M.L., Marathe C., Tontonoz P., Castrillo A., Corraliza I.* Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol. Endocrinol.*, 2008, v. 22 (6), p. 1394-1402.
 13. *Hronek M., Vachtlova D., Kudlackova Z., Jilek P.* Antifungal effect in selected natural compounds and probiotics and their possible use in prophylaxis of vulvovaginitis. *Ceska Gynekology*, 2005, v. 70 (5), p. 395-399.
 14. *Hudault S., Guignot J., Servin A.L.* Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection. *Gut*, 2001, v. 49 (1), p. 47-55.
 15. *Iyamu E.W., Asakura T., Woods G.W.* A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of arginase activity in vitro. *Anal. Biochem.*, 2008, v. 383 (2), p. 332-334.
 16. *Kondoh T., Kameishi M., Mallick H.N., Ono T., Torii K.* Lysine and arginine reduce the effects of cerebral ischemic insults and inhibit glutamate-induced neuronal activity in rats. *Front. Integr. Neurosci.*, 2010, v. 4, p. 18-23.
 17. *Leonard B., Maes M.* Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2012, v. 36 (2), p. 764-785.
 18. *Lodinová-Zádníková R., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H.* Oral administration of probiotic Escherichia coli after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Inter. Arch. Allerg. Immunol.*, 2003, v. 131 (3), p. 209-211.
 19. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265-275.
 20. *Mathiesen S., Lindemann D., Warnken M., Juergens U.R., Racké K.* Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, v. 579 (1-3), p. 403-410.
 21. *Movsesyan H.A., Alchujyan N.Kh., Aghababova A.A., Movsesyan N.H., Hovhannisyanyan M.R., Hakobyan A.M., Hovsepyan I.V., Khachatryan H.F., Kevorkian G.A.* Effects of d-amphetamine on the regional activity of arginase isoforms in the rat corticolimbic brain. *Ученые записки ЕГУ, Химия и Биология/ Proceedings of the YSU, Chemistry and biology*, 2016, v. 3, p. 40-47.
 22. *Robinson T.E., Camp D.M.* Long-lasting effects of escalating doses of d-amphetamine on brain monoamines, amphetamine-induced stereotyped behavior and spontaneous nocturnal locomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1987, v. 26 (4), p. 821-827.
 23. *Siwek M., Sowa-Kucma M., Styczen K., Misztak P., Szewczyk B., Topor-Madry R., Nowak G., Dudek D., Rybakowski J.K.* Thiobarbituric acid-reactive substances: markers of an acute episode and a late stage of bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 2016, v. 73 (2), p. 116-122.
 24. *Svinarev V.I., Syatkin S.P., Frolov V.A., Zaletok S., Golomazova K.A., Shevchenko A.A., Fedoronchuk T.V., Neborak K., Natroshvili N.* The role of polyamines in etiopathogenesis of schizophrenia. *Springer Wien New York. Amino Acids*, 2007, v. 33, p. 43-48.
 25. *Uriita Y., Goto M., Watanabe T., Matsuzaki M., Gomi A., Kano M., Miyazaki K., Kaneko H.* Continuous consumption of fermented milk containing Bifidobacterium bifidum YIT 10347 improves gastrointestinal and psychological symptoms in patients with functional gastrointestinal disorders. *Biosci. Microbiota Food Health*, 2015, v. 34 (2), p. 37-44.