

**ВЛИЯНИЕ ПОЛА НА РАЗМЕР ИНФАРКТА МИОКАРДА И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ И СИСТЕМНЫМ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ОТВЕТОМ В УСЛОВИЯХ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ**

© 2022 г. Ю. Ю. Боршев<sup>1</sup>, И. Ю. Буровенко<sup>1</sup>, С. М. Минасян<sup>1</sup>, Е. С. Процак<sup>1</sup>,  
В. Ю. Борщев<sup>2</sup>, О. В. Борщева<sup>1</sup>, И. Г. Зубков<sup>1</sup>, М. М. Галагудза<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Поступила в редакцию 23.11.2021 г.

После доработки 26.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

**Цель работы:** исследование устойчивости миокарда к ишемии—реперфузии и поведенческих реакций с учетом половых различий у крыс в экспериментальной модели ожирения и синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). *Материал и методы:* эксперименты были выполнены на крысах-самцах и самках линии Sprague-Dawley в возрасте 3 мес. с первичным висцеральным ожирением. ССВО моделировали путем однократного введения уксусной кислоты в прямую кишку, после чего внутривенно вводили смесь антимикробных препаратов в течение 3 дней. Крысам другой группы с момента моделирования ССВО в течение 8 дней перорально вводили смесь пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) в концентрации КОЕ  $10^8$  на одно животное. Поведенческие тесты “открытое поле”, “приподнятый крестообразный лабиринт”, “темно-светлая камера” проводили поочередно перед окончанием опыта. По завершении опыта проводили оценку уровня фактора некроза опухолей- $\alpha$ , интерлейкина-2, лептина, липополисахарида, трансформирующего фактора роста- $\beta$  и мозгового нейротрофического фактора в крови, изучали гемодинамические параметры и устойчивость миокарда к ишемии—реперфузии на модели изолированного сердца. **Результаты:** в группе самок после моделирования ССВО наблюдали большее потребление корма из расчета на 1 г массы тела и более выраженные тромбоцитоз и гранулоцитоз по сравнению с самцами. В сыворотке крови у самок отмечались более высокие уровни фактора некроза опухоли- $\alpha$ , лептина, интерлейкина-2 и липополисахарида по сравнению с самцами, а также более низкий уровень трансформирующего фактора роста- $\beta$ . У самцов отмечено пробиотическое модулирование ориентировочно-исследовательского поведения и тревожности, тогда как у самок пробиотиками корректировалась скорость выработки условных рефлексов. Значимых различий гемодинамических параметров, а также размера инфаркта между исследованными группами не наблюдалось. **Заключение:** полученные данные свидетельствуют о значимой роли половых гормонов в патогенезе ССВО, а также о различном ответе самок и самцов на пробиотическую терапию. Результаты в целом показывают более высокую интенсивность компенсаторно-приспособительных реакций и большую эффективность пробиотической коррекции ССВО у самок крыс по сравнению с самцами. В то же время, размер инфаркта не отличался у самок и самцов.

**Ключевые слова:** синдром системного воспалительного ответа, поведенческие реакции, размер инфаркта, пол, самки, самцы, пробиотики

**DOI:** 10.31857/S0869813922020030

## ВВЕДЕНИЕ

Первоначальное понимание стресса как универсального адаптационного синдрома [1] в настоящее время рассматривается в патофизиологическом смысле как термин, характеризующий нейроэндокринную активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и возникающие при этом биохимические и структурные последствия. В связи с этим, к понятию стресса весьма близко современное понимание синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), осложняющего воспаление и формирующегося при выраженной эндотоксинемии, сопровождающейся иммунопатологическими реакциями, системными нарушениями микроциркуляции, ДВС-синдромом и, при отсутствии лечения, полиорганной недостаточностью [2, 3]. В контексте стрессоустойчивости, помимо наследственных, возрастных, экологических и прочих факторов, необходимо учитывать половые (биологические) и полоролевые (социальные) аспекты [4]. Хорошо известно, что мальчики болеют аутизмом в 4.0–5.1 раза чаще, чем девочки [5]; женщины страдают депрессией и тревожными расстройствами в два раза чаще, чем мужчины [6]. У женщин чаще развивается посттравматическое стрессовое расстройство [7], болезнь Альцгеймера [8] и аутоиммунные заболевания, а у мужчин – сердечно-сосудистые [9] и некоторые инфекционные заболевания [10].

Исследователям хорошо известно, что крысы линии Sprague-Dawley (SD) являются генетически однородными и характеризуются поведенческой стабильностью, что зачастую предопределяет включение этой линии в эксперимент. Однако даже среди животных этой линии в зависимости от питомника имеется определенная вариабельность физиологических реакций. Например, крысы-самцы NTac:SD (Taconic (Ntac:SD, Germantown, NY) не являются адекватной моделью для исследования в условиях, вызывающих анксиогенный эффект, потому что они предрасположены к повышенному тревожному поведению, тогда как CRL:SD (Charles River, Raleigh, NC) или Hsd:SD male (Envigo, Frederick, MD) крысы являются более подходящими для подобных исследований [11].

В данной работе для определения половых различий при стрессирующем воздействии на различные системы организма была использована модель ССВО с пробиотической терапией у крыс линии SD. Экспериментальная модель включает в себя первичное висцеральное ожирение, химически индуцированное воспаление толстой кишки и антибиотик-индуцированный дисбиоз [12]. Ожирение, метаболический синдром, атерогенная дислипидемия и сахарный диабет являются важнейшими патогенетически и/или генетически взаимосвязанными между собой факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Согласно современным представлениям, основные компоненты метаболического синдрома представляют собой нарушения углеводного обмена, возникающие, в частности, в результате дисбаланса кишечной микробиоты, что обуславливает концепцию терапевтического использования пробиотиков. Также в течение последних десятилетий активно изучается роль стресса в патофизиологии ожирения и метаболического синдрома [13], в том числе в связи с воспалением [14]. Имеются данные о влиянии качественного состава высокожировой диеты на цитокиновый профиль и устойчивость миокарда к ишемии–реперфузии у крыс с ССВО в связи с изменениями состава кишечной микробиоты [15]. При этом в литературе практически отсутствуют данные о влиянии половых гормонов на устойчивость миокарда к ишемическому–реперфузионному повреждению в условиях ССВО.

Целью работы являлось изучение влияния пола на устойчивость миокарда к ишемии–реперфузии, на уровень гормонов и цитокинов в крови, а также поведенческие реакции у крыс линии SD при экспериментальном моделировании ССВО на фоне пробиотической коррекции.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах линии SD со статусом SPF (Specific Pathogen Free), полученных из питомника “Пушино”: самки массой 230–260 г, самцы массой 380–420 г, в возрасте 13–14 нед. Исследование проводилось в соответствии с Директивой Европейского Совета по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными (Директива 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г.). Животные случайным образом распределялись по группам: 1) контроль: самцы STR-M ( $n = 8$ ) и самки STR-F ( $n = 8$ ) – крысы находились на стандартной диете *ad libitum* и получали ежедневно *per os* в течение 28 дней по 4 мл физиологического раствора; 2) моделирование ССВО: самцы SIR-M ( $n = 8$ ) и самки SIR-F ( $n = 8$ ) – у крыс с предварительно индуцированным жируглевой диетой ПВО (28-дневным внутрижелудочным введением 2 г полиненасыщенных жиров и 1 г сахарозы в дополнение к стандартной диете), моделировали ССВО путем воспроизведения химически индуцированного колита, что подробно описано ранее [12]. SIR – systemic inflammatory response (системный воспалительный ответ). Начиная со следующего дня, этим же животным внутрижелудочно вводили 1 мл физиологического раствора и 1 мл раствора смеси антимикробных препаратов (АМП: амоксициллин, метронидазол и кларитромицин) в суточной дозе по 15 мг каждого АМП на крысу в течение 3 дней; 3) пробиотическая коррекция: самцы PRC-M ( $n = 8$ ) и самки PRC-F ( $n = 8$ ) – крысам, прошедшим процедуры согласно предыдущему протоколу, вместо 1 мл физиологического раствора в течение 8 дней вводили 1 мл раствора смеси пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), в концентрации  $10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на одно животное. Все манипуляции с самками начинали в начале стадии диэструса. В течение 2-х нед., ежедневно, в утреннее время тонкой глазной пипеткой брали мазки (влагалищные смывы), помещали на предметное стекло и рассматривали под микроскопом при увеличении в 300 раз в слегка затемненном поле. Фаза диэструса характеризуется множеством лейкоцитов, единичных эпителиальных клеток и значительным количеством слизи. После нескольких циклов формировались группы с совпадающими фазами для начала эксперимента.

Через 8 дней после моделирования ССВО на фоне соответствующей диеты, крыс экспериментальных групп наркотизировали золетил-ксилазиновым наркозом: золетил 0.3 мг в/м (Virbac, Франция), ксиланит 0.8 мг в/м (ЗАО НИТА-ФАРМ, Россия, г. Саратов), атропина сульфат 0.1%-ный раствор – 0.01 мл п/к из расчета на 100 г массы тела животного. Наркотизировали изофлураном, брали цельную кровь из задней полой вены для гематологического, биохимического и иммунологического анализа. Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, URIT Medical Electronic, Китай). Уровень фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), лептина (LEP), интерлейкина-2 (IL-2), трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) и липополисахарида (LPS) оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай). Ориентировочно-исследовательское поведение оценивали в тесте “открытое поле” (ОП), тревожность – в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), формирование условного рефлекса активного избегания (УРАИ) проводились с помощью аппаратно-программных комплексов – АПК “Минотавр” и АПК “Шелтер” (Нейроботикс, Россия). Посмертно измерялась масса внутренних органов. Сравнение массы внутренних органов посредством коэффициентов их отношения к массе тела за вычетом массы слепой кишки вычисляли по формуле  $K_{мо} = (МО/МТ - МСЛК) \times 100\%$ , где МО – масса органа, МТ – масса тела, МСЛК – масса слепой кишки. На протяжении всего эксперимента, ежедневно с 9 до 10 ч утра проводили оценку клинического статуса животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных.

После торакотомии сердце извлекали из грудной клетки и подключали к модернизированному аппарату Лангендорфа. Перфузию осуществляли ретроградно через аорту оксигенизированным буфером Кребса–Хинзеляйта при постоянном давлении 80 мм рт. ст. В течение всего эксперимента температура сердца и растворов поддерживалась на уровне 37°C. В полость левого желудочка вводили полиэтиленовый баллон для регистрации давления в изоволюметрическом режиме [16]. В ходе перфузии изолированного сердца регистрировали частоту сердечных сокращений (уд./мин.), коронарный поток (мл/мин), величины конечно-диастолического и систолического давления в левом желудочке на персональном компьютере с помощью программы PhysExp 3.0 [17]. После завершения реперфузии осуществляли планиметрическую оценку размера инфаркта путем окраски срезов сердца 1%-ным раствором трифенилтетразолия хлорида. Размер инфаркта выражали в процентах от общей площади среза и вычисляли среднее значение для данного сердца по результатам анализа 5 срезов.

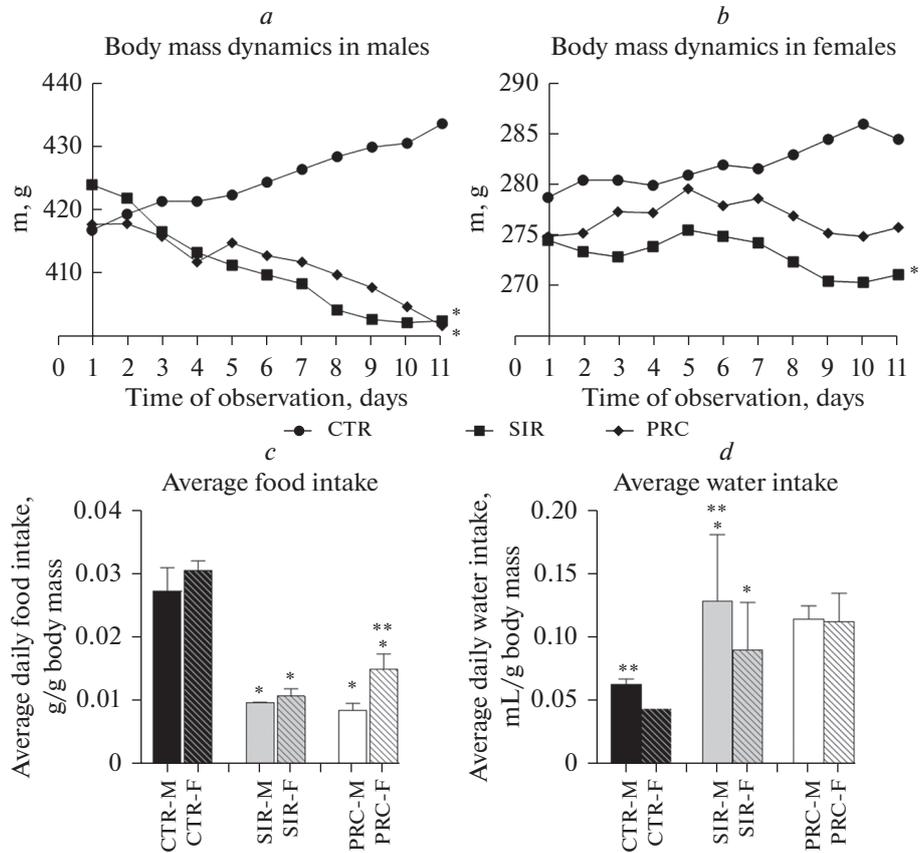
Для каждого из определяемых показателей рассчитывали среднее значение ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\pm SD$ ). После проверки выборки на нормальность распределения статистический анализ полученных результатов проводился с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (программный пакет STATISTICA 9.0). Статистическая значимость различий считалась достоверной при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Масса тела, потребление воды и корма*

Существенные изменения динамики массы тела в опытных группах с моделированием ССВО по отношению к СТР на протяжении последних 8 дней были отмечены для крыс обоих полов. У крыс в группе СТР-F масса тела от начала до конца наблюдения увеличилась с  $278 \pm 5$  до  $285 \pm 1$  г ( $p < 0.05$ ); в группе SIR-F уменьшилась с  $275 \pm 4$  до  $271 \pm 6$  г ( $p < 0.05$ ), а в PRC-F не изменилась ( $275 \pm 13$  и  $276 \pm 9$  г,  $p > 0.05$ ), что показывает эффективность пробиотической терапии для этой группы. В группе СТР-M масса тела увеличилась с  $417 \pm 19$  до  $434 \pm 23$  г, в группе СВО-M уменьшилась с  $424 \pm 2$  до  $403 \pm 5$  г ( $p < 0.05$ ), а в группе PRC-M – с  $418 \pm 8$  до  $393 \pm 14$  г ( $p < 0.05$ ) (рис. 1а, б). У крыс групп SIR-F и SIR-M, а также групп PRC-F и PRC-M потребление корма в течение 8 дней после моделирования ССВО по сравнению с соответствующими контролями снижалось многократно ( $p < 0.05$ ). В условиях ССВО самки потребляли корм несколько больше, чем самцы, причем для группы PRC-F эта разница была статистически значимой ( $p < 0.05$ ). Среднее потребление воды из расчета на 1 г массы тела в группе СТР-M было больше на 30%, чем в группе СТР-F ( $p < 0.05$ ). В группах SIR для самцов и самок отмечено 2-кратное увеличение потребления воды по отношению к СТР при сохранении значимых различий между самцами и самками ( $p < 0.05$ ). В группах PRC-F и PRC-M потребление воды не отличалось (рис. 1с, д).

В группах самок (SIR-F и PRC-F) произошло существенное увеличение массы селезенки ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой СТР-F. Значимое кратное увеличение массы желудка и слепой кишки с содержимым наблюдали в группах PRC-F, PRC-M, SIR-M, SIR-F ( $p < 0.05$ ). В группах SIR-M и PRC-M в отличие от SIR-F и PRC-F отмечено значимое увеличение депозитов висцерального жира по отношению к соответствующим контролям ( $p < 0.05$ ) вследствие индуцированного жироуглеводной диетой первичного висцерального ожирения. Также масса жировой ткани была значимо выше в группе СТР-M, чем в группе СТР-F ( $p < 0.05$ ) (табл. 1).



**Рис. 1.** Динамика изменения массы тела (a, b), среднее потребление корма (c) и воды (d). CTR – контрольная группа, SIR – группа с моделированным синдромом системного воспалительного ответа, PRC – группа с пробиотической терапией, М – самцы, F – самки. \* –  $p < 0.05$  по отношению к соответствующему полу CTR, \*\* –  $p < 0.05$  различия между самками и самцами.

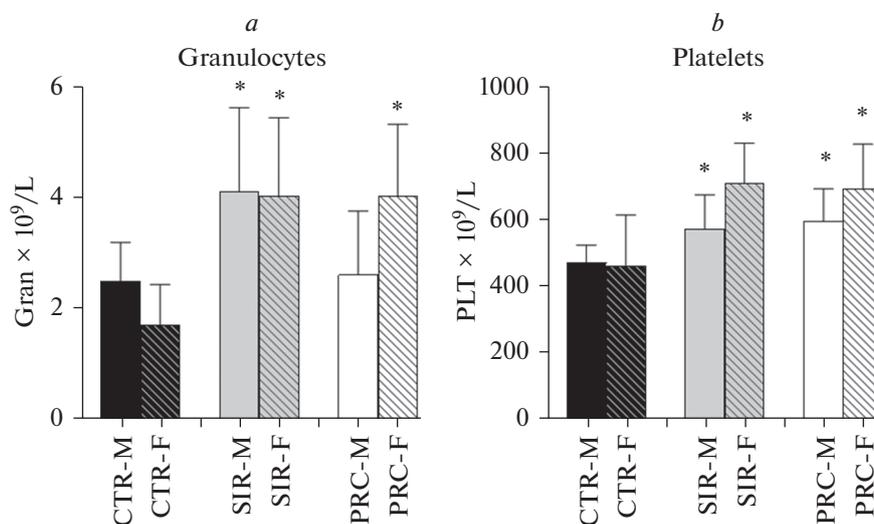
*Клинический анализ крови*

В группах SIR-M и SIR-F отмечен лейкоцитоз ( $p < 0.05$ ) за счет увеличения фракции гранулоцитов. Необходимо отметить, что в группе PRC-F этот показатель не изменился, тогда как для PRC-M не отличался от группы CTR-M. В группах

**Таблица 1.** Коэффициенты отношения массы внутренних органов к массе тела

Группа	Печень	Почки	Селезенка	Висцеральный жир	Желудок с содержимым	Слепая кишка
CTR-M	2.98 ± 0.24	0.513 ± 0.033	0.194 ± 0.004	3.90 ± 1.25	0.95 ± 0.35	1.36 ± 0.24
CTR-F	2.51 ± 0.74	0.537 ± 0.03	0.226 ± 0.002	2.18 ± 0.36**	1.11 ± 0.15	1.67 ± 0.41
SIR-M	2.79 ± 0.25	0.512 ± 0.06	0.197 ± 0.004	4.97 ± 1.49*	1.76 ± 0.24*	2.29 ± 0.45*
SIR-F	2.93 ± 0.29	0.538 ± 0.05	0.263 ± 0.007*	2.88 ± 0.76	2.22 ± 0.46*	3.69 ± 1.20*
PRC-M	2.73 ± 0.34	0.529 ± 0.05	0.225 ± 0.006	4.89 ± 1.12*	1.40 ± 0.48*	2.82 ± 0.38*
PRC-F	2.99 ± 0.21	0.544 ± 0.05	0.258 ± 0.028*	2.78 ± 0.46	2.66 ± 0.20*	3.94 ± 0.73*

\* –  $p < 0.05$  по отношению к CTR, \*\* –  $p < 0.05$  различия между CTR-M и CTR-F.



**Рис. 2.** Количество гранулоцитов (*a*) и тромбоцитов (*b*) в крови у крыс.

CTR – контрольная группа, SIR – группа с моделированным синдромом системного воспалительного ответа, PRC – группа с пробиотической терапией, М – самцы, F – самки.

\* –  $p < 0.05$  по отношению к соответствующему полу CTR.

PRC-F, PRC-M, SIR-M, SIR-F отмечен тромбоцитоз ( $p < 0.05$ ) (рис. 2*a, b*). Существенных изменений количества эритроцитов не отмечено.

#### *Уровень лептина, цитокинов и липополисахарида*

Наиболее значимые различия между самцами и самками были обнаружены при моделировании ССВО и оценке уровней TNF- $\alpha$ , LEP, IL-2, LPS и TGF- $\beta$ 1 в крови (рис. 3). Уровень TNF- $\alpha$  в сыворотке крови в группе SIR-F был более чем в 2 раза больше, чем в группе SIR-M ( $p < 0.05$ ), несмотря на отсутствие различий между группами CTR-F и CTR-M, что указывает на большую лабильность воспалительного ответа у самок. Влияния пробиотиков на показатель TNF- $\alpha$  для обоих полов не обнаружено. В группе SIR-F отмечено двукратное увеличение концентрации лептина и IL-2 ( $p < 0.05$ ). Существенное уменьшение уровня TGF- $\beta$ 1 в группах SIR-F и SIR-M (в 8 и 5 раз соответственно) и двукратное ( $p < 0.05$ ) увеличение концентрации LPS носило общий характер для обоих полов. Влияние пробиотиков на измеряемые параметры отсутствовало за исключением снижения уровня лептина в группе PRC-F. Уровень BDNF не различался во всех исследованных группах.

#### *Поведенческие реакции*

Анализ параметров ориентировочно-исследовательского поведения в новых стрессогенных условиях в тесте “открытое поле” представлен в табл. 2. Отмечено большее количество стоек и заглядываний в группе CTR-F по сравнению с группой CTR-M ( $p < 0.05$ ) при отсутствии различий между этими группами по другим параметрам ОИП. В группе SIR-M по сравнению с группой CTR-M обнаружено большее значение времени пассивности ( $p < 0.05$ ). В группе SIR-F отмечено большее значение времени активности в сравнении как с группой CTR-F, так и с SIR-M, а также большее значение пройденного пути и заглядываний в сравнении с группой

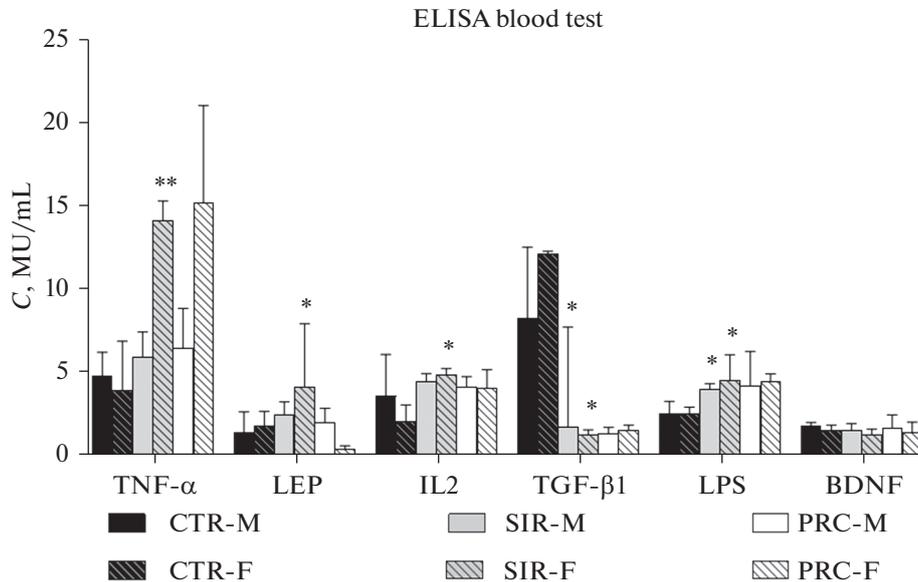


Рис. 3. Уровень TNF- $\alpha$ , LEP, IL-2, TGF- $\beta$ , LPS и BDNF в крови.

CTR – контрольная группа, SIR – группа с моделированным синдромом системного воспалительного ответа, PRC – группа с пробиотической терапией, M – самцы, F – самки. \* –  $p < 0.05$  по отношению к соответствующему полу CTR, \*\* –  $p < 0.05$  различия между самками и самцами.

SIR-M ( $p < 0.05$ ). В группе PRC-F получено более высокое значение времени активности, пройденного пути, количества стоек и заглядываний по сравнению с группой PRC-M ( $p < 0.05$ ).

Оценку степени тревожности, возникающей в результате стресса, вызванного высотой и необычностью ситуации, проводили помещением на открытое освещенное пространство в тесте ПКЛ. Наиболее выраженные различия по группам отмечены в центральной зоне испытательной площадки. Время активности  $T$  (акт) и пройденный путь ( $S$ ) в группах SIR-M и SIR-F многократно уменьшились по отношению к CTR-M и CTR-F ( $p < 0.05$ ). Характер изменений количества стоек в группах аналогичен предыдущему описанию. Время пассивного нахождения  $T$  (пас) в этой зоне у крыс группы SIR-F значительно уменьшилось в связи с нахождением в

Таблица 2. Средние значения и их стандартные отклонения ( $M \pm SD$ ) показателей поведения крыс в тесте “открытое поле”: время активности,  $T$  (акт), с; время пассивности,  $T$  (пас), с; пройденный путь, ( $S$ ), м; количество стоек,  $n$  (стойки); количество заглядываний,  $n$  (норки)

Группа	$T$ (акт), с	$T$ (пас), с	Путь ( $S$ ), м	Стойки, $n$	Норки, $n$
CTR-M	64 ± 22	207 ± 23	10 ± 3	6 ± 4	1 ± 1
CTR-F	81 ± 13	200 ± 21	14 ± 2	11 ± 10**	3 ± 2**
SIR-M	52 ± 5	245 ± 12*	9 ± 1	16 ± 4	0 ± 0
SIR-F	124 ± 12*	171 ± 10	18 ± 2*	23 ± 10	5 ± 1*
PRC-M	33 ± 7	261 ± 9*	7 ± 1	6 ± 1	1 ± 1
PRC-F	108 ± 14**	187 ± 11**	16 ± 2**	20 ± 4**	4 ± 3**

\* –  $p < 0.05$  по отношению к соответствующему полу CTR, \*\* –  $p < 0.05$  различия между полами.

**Таблица 3.** Средние значения и их стандартные отклонения ( $M \pm SD$ ) показателей поведения крыс в центральной зоне в тесте ПКЛ: время активности  $T$  (акт), с; время пассивности  $T$  (пас), с; пройденный путь ( $S$ ), м; количество стоек,  $n$  (стойки)

Группа	$T$ (акт), с	$T$ (пас), с	Путь ( $S$ ), м	Стойки, $n$
CTR-M	$20 \pm 11$	$50 \pm 8$	$3.2 \pm 1.2$	$11 \pm 8$
CTR-F	$23 \pm 5$	$88 \pm 43$	$3.8 \pm 0.2$	$8 \pm 1$
SIR-M	$4 \pm 1^*$	$40 \pm 32$	$0.9 \pm 0.4^*$	$3 \pm 2^*$
SIR-F	$7 \pm 3^*$	$11 \pm 1^*$	$0.8 \pm 0.2^*$	$1 \pm 0.5^*$
PRC-M	$22 \pm 4$	$73 \pm 63$	$3.3 \pm 2.5$	$5 \pm 4$
PRC-F	$4 \pm 2^*$	$6 \pm 5^*$	$0.6 \pm 0.4^*$	$0.2 \pm 0.1^*$

\* –  $p < 0.05$  по отношению к соответствующему полу CTR.

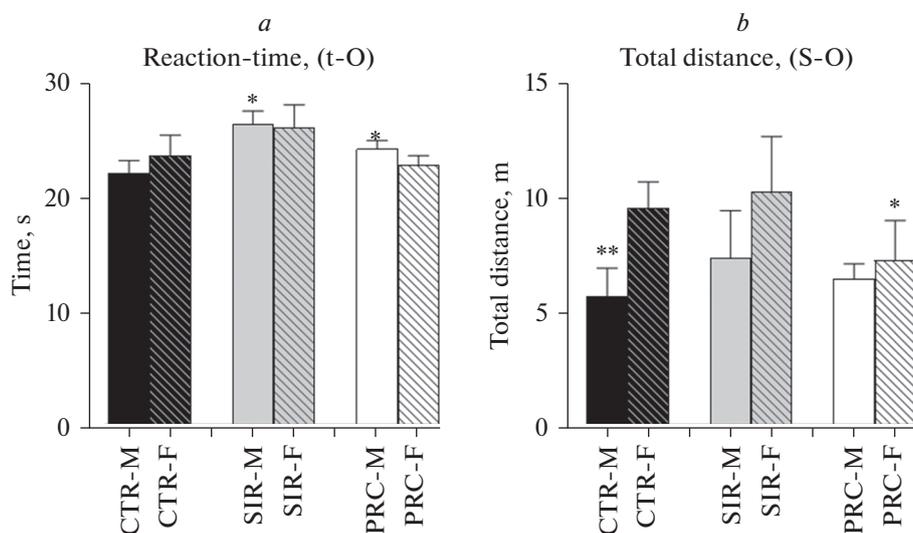
других зонах ( $p < 0.05$ ). В группе PRC-M все значения максимально приблизились к CTR-M, а в группе PRC-F остались близки к SIR-F (табл. 3).

Время реакции в цикле (УРАИ, АПК “Шелтер”): звуковой сигнал–свет–электрический стимул–переход в темную камеру; в группе CTR-M составило  $21.7 \pm 1.1$  с, а в CTR-F –  $23.2 \pm 1.7$  с. После моделирования ССВО время цикла увеличилось в группе SIR-M до  $25.9 \pm 1.1$  с ( $p < 0.05$ ), а в SIR-F до  $25.6 \pm 1.9$  с, а после пробиотической терапии в группе PRC-M уменьшилось до  $23.7 \pm 0.8$  с ( $p < 0.05$ ), а в группе PRC-F – до  $22.4 \pm 0.8$  с ( $p > 0.05$ ). Среднее перемещение по клетке при переходе из одной клетки в другую у самцов в контроле составило  $5.6 \pm 1.2$  м, а у самок  $9.4 \pm 1.2$  м, т.е. значимо различалось между собой ( $p < 0.05$ ). Изменение этого параметра в группах SIR-M и PRC-M оказалось недостоверным, а у самок наблюдали значимое уменьшение – с  $10.1 \pm 2.4$  для SIR-F до  $7.1 \pm 1.7$  в PRC-F ( $p < 0.05$ , рис. 4а, б).

Гемодинамические параметры изолированного сердца в данном исследовании не отличались между группами в периоде стабилизации и в ходе реперфузии. Более того, размер инфаркта в группах CTR, SIR и PRC для обоих полов значимо не различался, имея некоторую тенденцию к увеличению в группах с введением пробиотиков (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

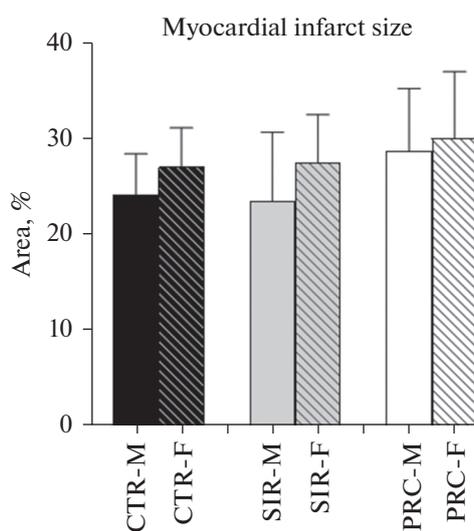
Каскад сложных молекулярных, эпигенетических, биохимических, гормональных, нервно-гуморальных и иных реакций при ССВО может иметь существенные половые различия, которые находят свое отражение в реактивности иммунной системы, особенностях внутриклеточного сигналинга, влиянии половых гормонов и гормонов стресса на систему нейровоспаления и т.д. [18–20]. Наиболее часто в эксперименте используется модель нейровоспаления, вызванная провоспалительным стрессом, индуцированным инъекцией LPS [21]. LPS является составным компонентом клеточной стенки различных грамотрицательных бактерий. Первичными клетками-мишенями для LPS являются фагоциты, которые экспрессируют связанный с мембраной антиген CD14 (mCD14) и толл-подобные рецепторы 4. LPS-связывающий протеин катализирует переход мономерного LPS из агрегатных комплексов к связывающему рецептору CD14 (mCD14) на поверхности фагоцитов, который в свою очередь ведет к активации ядерного транскрипционного фактора  $\kappa B$  и экспрессии большого числа эндогенных провоспалительных медиаторов (цитокины, хемокины и др.) через TLR4\*MD-2 комплекс [22]. В этой работе обнаружено значимое снижение продукции TGF- $\beta 1$  при повышении концентрации LPS в крови, показанное ранее в литературе [23]. Известная лимитирующая роль эстрогенов



**Рис. 4.** Результаты измерений в тесте “темно-светлая камера”, АПК “Шелтер”: время реакции в цикле (а), среднее перемещение (b).

CTR – контрольная группа, SIR – группа с моделированным синдромом системного воспалительного ответа, PRC – группа с пробиотической терапией, М – самцы, F – самки.

\* –  $p < 0.05$  по отношению к соответствующему полу CTR, \*\* –  $p < 0.05$  различия между самками и самцами.



**Рис. 5.** Размер площади инфаркта миокарда изолированного сердца. CTR – контрольная группа, SIR – группа с моделированным синдромом системного воспалительного ответа, PRC – группа с пробиотической терапией, М – самцы, F – самки.

для ожирения в данной работе подтверждена меньшим содержанием висцерального жира у самок во всех опытных группах по сравнению с самцами, при незначительном увеличении показателя у крыс-самок с первичным висцеральным ожирением по отношению к контролю при указанном сроке жируглевой диеты. Вероятно, снижением уровня эстрогенов при моделировании ССВР можно объяснить существенное увеличение концентрации TNF- $\alpha$  [24]. Необходимо заметить, что введение пробиотиков не вызвало существенных изменений показателей исследуемых цитокинов в опытных группах, в связи с чем модулирование уровня лептина у крыс-самок с пробиотической терапией вызывает особый интерес при исследовании молекулярных мишеней, учитывая сведения о синергичном снижении уровня эстрадиола (E2) и лептина у овариоэктомированных крыс, при увеличении показателя TNF- $\alpha$  [25].

Предложенная нами модель ССВО, включающая химически индуцированный колит и антибиотик-индуцированный дисбиоз, разработана с учетом использования в эксперименте животных со статусом SPF или улучшенных конвенциональных животных в виварии барьерного типа. Проведенные нами ранее исследования изменений состава кишечной микробиоты на данной модели показали существенное снижение представительства *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. при увеличении грамотрицательных *E. coli* и *Proteus* spp., что согласуется с данными о существующем антагонизме между некоторыми штаммами *Lactobacillus* spp. и *E. coli* в единой экосистеме. В этой же работе показано существенное увеличение концентрации LPS в крови, модулируемое применением АМП широкого спектра действия [12].

В данном исследовании основной целью являлось изучение устойчивости миокарда к ишемии—реперфузии и поведенческих реакций у крыс линии SD обоих полов. В отличие от полученных ранее данных об увеличении размера инфаркта миокарда на модели ССВО у самцов стока Wistar в зависимости от возраста с демонстрацией пробиотического кардиопротективного эффекта [26], в данной работе как у самцов, так и у самок мы не обнаружили значимых различий в исследуемых группах. Возникает предположение, что обнаруженные существенные различия в эмоциональной реактивности, когнитивных способностях, стрессоустойчивости и тревожном поведении между крысами стока Wistar и линии Sprague-Dawley [27–29] распространяются в широком смысле на стрессоустойчивость и в отношении исследования сердечно-сосудистой системы, что подтверждается рекомендациями по использованию данной линии в отличных от кардиологических целей. Представляется полезным более глубокий анализ молекулярно-генетических основ устойчивости миокарда на модели изолированного сердца в зависимости от генетического разнообразия экспериментальных животных. Также в модифицированной нами модели ССВО, основанной на химически индуцированном воспалении кишечника [30], нами получены новые сведения о поведенческих реакциях самок и самцов линии SD. На белых беспородных крысах-самцах ранее было показано, что при действии длительного неконтролируемого стресса у активных доминантов в отличие от неактивных субординантов наблюдаются признаки депрессивно-подобного состояния, выраженного в достоверном снижении показателей динамики массы тела, увеличении уровня ангедонии, тревожности, снижении двигательной и исследовательской активности на 5-й день воздействия, увеличении болевого порога по сравнению с фоном [31]. У субординантов с неактивным типом стрессорной реакции на 5-й день воздействия наблюдается реакция, выраженная в снижении двигательной и исследовательской активности и увеличении тревожности [31]. Объяснение различной реакции на стресс, имеющее отношение к условиям данного эксперимента, можно найти в работе о протективном действии эстрогенов на LPS-индуцированное нейровоспаление [32].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительный неконтролируемый стресс неоднозначно влияет на крыс линии SD различного пола. В группе самок после моделирования ССВО наблюдали более значимые изменения ряда параметров по сравнению с самцами, а именно, большее потребление корма из расчета на 1 г массы тела и более выраженные тромбоцитоз и гранулоцитоз. Уровень TNF- $\alpha$  в сыворотке крови у самок с моделированием ССВО по сравнению с контрольными самками повысился на 250%, лептина – на 120%, IL-2 – на 130%, LPS – на 74%. При этом концентрация TGF- $\beta$  в этих же группах снизилась более чем в 10 раз. Ориентировочно-исследовательское поведение крыс-самок отличалось большей активностью по сравнению с самцами после моделирования ССВО, у которых после пробиотической терапии оно приблизилось к контролю. Такой же характер изменений тревожности отметили в тесте ПКЛ при сравнении самок с самцами, однако скорость выработки условных рефлексов в тесте УРАИ у самок была существенно выше. Значимых различий гемодинамических параметров изолированного сердца, а также размера инфаркта у самок и самцов линии SD отмечено не было.

Полученные данные дают дополнительные основания для понимания роли пола и половых гормонов в развитии системного воспалительного ответа и стресса, что лежит в основе различной реакции на течение болезни и на лекарственные препараты, а также определяет различную эффективность реабилитации.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №18-15-00153).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Ю.Ю.Б.), сбор данных (Ю.Ю.Б., С.М.М., О.В.Б., Е.С.П., И.Г.З.), обработка данных (М.М.Г., Ю.Ю.Б., В.Ю.Б., И.Ю.Б., И.Г.З.), написание и редактирование манускрипта (Ю.Ю.Б., М.М.Г., И.Ю.Б.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селье Г (1960) Очерки об адапционном синдроме. М. Медгиз. [Sel'e G (1960) Essays on Adaptation Syndrome. Moscow. Medgiz. (In Russ)].
2. Иващенко ВВ, Чернышев ИВ, Перепанова ТС, Никонова ЛМ, Казаченко АВ (2012) Стресс и синдром системного воспалительного ответа. Экспер и клин урол 4: 20–22. [Ivashchenko VV, Chernyshev IV, Perepanova TS, Nikonova LM, Kazachenko AV (2012) Stress and Systemic Inflammatory Response Syndrome. Exp Clin Urol 4: 20–22 (In Russ)].
3. Савельев ВС, Гельфанд БР (ред) (2006) Сепсис в начале XXI века. М. Изд-во Литтерра. [Savelyev VS, Gelfand BR (eds) Sepsis at the beginning of the XXI century M. Publ House Litterra. (In Russ)].
4. Дмитриева ТБ, Дроздов АЗ (2010) Половые и гендерные аспекты стрессоустойчивости (аналитический обзор). Часть 1. Рос психиатр журн 1: 18–24. [Dmitrieva TB, Drozdov AZ (2010) Sexual and gender aspects of resistance to stress (analytical review). Part 1. Russ Psychiatr J 1: 18–24. (In Russ)].
5. Custódio CS, Mello BSF, Filho AJMC, de Carvalho Lima CN, Cordeiro RC, Miyajima F, Réus GZ, Vasconcelos SMM, Barichello T, Quevedo J, de Oliveira AC, de Lucena DF, Macedo DS (2018) Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. Mol Neurobiol 55(5): 3775–3788. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0616-1>

6. *Parker G, Brotchie H* (2010) Gender differences in depression. *Int Rev Psychiatry* 22(5): 429–436. <https://doi.org/10.3109/09540261.2010.492391>
7. *Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen H-U* (2012) Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res* 21(3): 169–184. <https://doi.org/10.1002/mpr.1359>
8. *Laws KR, Irvine K, Gale TM* (2018) Sex differences in Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry* 31(2): 133–139. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000401>
9. *Kudielka BM, Kirschbaum C* (2005) Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol* 69(1): 113–132. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2004.11.009>
10. *Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR* (2009) Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation* 16(2): 106–113. <https://doi.org/10.1159/000180265>
11. *Tsuda MC, Mahdi S, Namchuk A, Wu TJ, Lucki I* (2020) Vendor differences in anxiety-like behaviors in female and male Sprague Dawley rats. *Physiol Behav* 227: 113131. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113131>
12. *Борщев ЮЮ, Буровенко ИЮ, Карасева АБ, Минасян СМ, Борщев ВЮ, Семенова НЮ, Борщева ОВ, Половинкин ВВ, Родионов ГГ, Суворов АН, Галагудза ММ* (2020) Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс. *Мед иммунол* 22(1): 87–98. [*Borshev YuYu, Burovenko IYu, Karaseva AB, Minasyan SM, Borshev VYu, Semenova NYu, Borshcheva OV, Polovinkin VV, Rodionov GG, Suvorov AN, Galagudza MM* (2020) Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats. *Med Immunol* 22(1): 87–98. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-MOS-1839>
13. *Brindley D* (1995) Role of glucocorticoids and fatty acids in the impairment of lipid metabolism observed in the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19 Suppl 1: S69–S75.
14. *Brunner EJ, Hemingway H, Walker BR, Page M, Clarke P, Juneja M, Shipley MJ, Kumari M, Andrew R, Seckl JR, Papadopoulos A, Checkley S, Rumley A, Lowe GD, Stansfeld SA, Marmot MG* (2002) Adrenocortical, autonomic, and inflammatory causes of the metabolic syndrome: nested case-control study. *Circulation* 106(21): 2659–2665. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000038364.26310.bd>
15. *Борщев ЮЮ, Буровенко ИЮ, Карасева АБ, Минасян СМ, Процак ЕС, Борщев ВЮ, Семенова НЮ, Борщева ОВ, Суворов АН, Галагудза ММ* (2021) Влияние качественного состава высокожировой диеты на уровень цитокинов и устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии у крыс с синдромом системного воспалительного ответа. *Мед иммунол* 23(5): 1091–1106. [*Borshchev YuYu, Burovenko IYu, Karaseva AB, Minasyan SM, Protsak ES, Borshchev VYu, Semenova NYu, Borshcheva OV, Suvorov AN, Galagudza MM* (2021) Influence of the qualitative composition of a high-fat diet on the level of cytokines and myocardial resistance to ischemia-reperfusion in rats with systemic inflammatory response syndrome. *Med Immunol* 23(5): 1091–1106. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOT-2166>
16. *Минасян СМ, Бадриханова ЛР, Галагудза ММ, Курапеев ДИ* (2008) Сравнительное исследование защитного эффекта гипотермии, ишемического preconditionирования и модифицированных кардиоплегических растворов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы. *Регионар кровообращ и микроциркул* 7(2): 72–78. [*Minasyan SM, Badrikhanova LR, Galagudza MM, Kurapeev DI* (2008) Comparative study of the protective effect of hypothermia, ischemic preconditioning and modified cardioplegic solutions in ischemia-reperfusion of an isolated rat heart. *Region Blood Circulat and Microcircul* 7(2): 72–78. (In Russ)].
17. *Королев ДВ, Александров ИВ, Галагудза ММ, Сыренский АВ, Сонин ДЛ, Егорова ЕИ* (2008) Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента. *Регионар кровообращ и микроциркул* 7(2): 79–84. [*Korolev DV, Aleksandrov IV, Galagudza MM, Syrenskiy AV, Sonin DL, Egorova EI* (2008) Automation of receiving and processing data from a physiological experiment. *Region Blood Circulat and Microcircul* 7(2): 79–84. (In Russ)].
18. *Berkiks I, Garcia-Segura LM, Nassiri A, Mesfioui A, Ouichou A, Boulbaroud S, Bahbiti Y, Lopez-Rodriguez AB, Hasnaoui E, El Hessni A* (2019) The sex differences of the behavior response to early Life immune stimulation: Microglia and astrocytes involvement. *Physiol Behav* 199: 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.037>
19. *Tchessalova D, Tronson NC* (2019) Memory deficits in males and females long after subchronic immune challenge. *Neurobiol Learn Mem* 158: 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.01.003>
20. *Villa A, Rizzi N, Vegeto E, Ciana P, Maggi A* (2015) Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Sci Rep* 5: 15224. <https://doi.org/10.1038/srep15224>

21. Брошевицкая НД, Павлова ИВ, Зайченко МИ, Онуфриев МВ, Моисеева ЮВ, Григорьян ГА (2020) Половые различия в оборонительном поведении взрослых крыс в ответ на ранний нейровоспалительный стресс. Журн высш нервн деятелн им ИП Павлова 70(2): 259–276. [Broshevitskaya ND, Pavlova IV, Zaychenko MI, Onufriyev MV, Moiseyeva YuV, Grigor'yan GA (2020) Sex differences in the defensive behavior of adult rats in response to early neuroinflammatory stress. IP Pavlov J Higher Nerv Activity 70 (2): 259–276. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044467720020057>
22. Alexander C, Rietschel ET (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res 7 (3): 167–202.
23. Grotenhuis N, De Witte SF, van Osch GJ, Bayon Y, Lange JF, Bastiaansen-Jenniskens YM (2016) Biomaterials influence macrophage-mesenchymal stem cell interaction in vitro. Tissue Eng Part A 22(17–18): 1098–1107. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0162>
24. Knowlton AA, Lee AR (2012) Estrogen and the cardiovascular system. Pharmacol Ther 135(1): 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.007>
25. Saral S, Saydam F, Dokumacioglu E, Atak M, Tümkeya L, Uydu HA (2021) Effect of white tea consumption on serum leptin, TNF- $\alpha$  and UCP1 gene expression in ovariectomized rats. Eur Cytokine Netw 32(2): 31–38. <https://doi.org/10.1684/ecn.2021.0467>
26. Borshchev YY, Sinitsa AV, Zakharchenko MM, Borshchev VY, Burovenko IY, Galagudza MM (2018) Effect of Antibiotic-Induced Disbiosis and Its Correction with Probiotics on Myocardial Tolerance to Ischemia-Reperfusion Injury in SPF Rats. Bull Exp Biol Med 166(4): 440–443. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04368-5>
27. Goepfrich AA, Gluch C, Friemel CM, Schneider M (2013) Behavioral differences in three Wistar Han rat lines for emotional reactivity, cognitive processing and ethanol intake. Physiol Behav 110–111: 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.019>
28. Honndorf S, Lindemann C, Töllner K, Gernert M (2011) Female Wistar rats obtained from different breeders vary in anxiety-like behavior and epileptogenesis. Epilepsy Res 94(1–2): 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.12.012>
29. Langer M, Brandt C, Löscher W (2011) Marked strain and substrain differences in induction of status epilepticus and subsequent development of neurodegeneration, epilepsy, and behavioral alterations in rats [corrected]. Epilepsy Res 96(3): 207–224. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.06.005>
30. Клёсов РА, Каркищенко ВН, Степанова ОИ, Баранова ОВ (2020) Сравнительное экспериментальное биомоделирование нпвс-индуцированного энтероколита. Биомедицина 16(1): 65–81. [Klyosov RA, Karkishchenko VN, Stepanova OI, Baranova OV (2020) Comparative experimental biomodelling of NSAID-induced enterocolitis. Biomedicine 16(1): 65–81. (In Russ)].
31. Немец ВВ, Шмурак ВИ, Соболев ВЕ, Гарнюк ВВ, Рован ЕД, Виноградова ЕП (2019) Влияние кратковременного и длительного неконтролируемого стресса на животных доминантного и субординантного социального статуса с различным типом стрессорной реакции. Рос физиол журн им. И.М. Сеченова 105(5): 608–618. [Nemets VV, Shmurak VI, Sobolev VE, Garnyuk VV, Rovani ED, Vinogradova EP (2019) Influence of short-term and long-term uncontrolled stress on animals of dominant and subordinate social status with different types of stress reaction. Russ J Physiol 105(5): 608–618. (In Russ)].
32. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A (2001) Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. J Neurosci 21 (6): 1809–1818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01809.2001>

### **Influence of Gender on the Size of Myocardial Infarction and Behavioral Responses in Obese Rats with Systemic Inflammatory Response under Probiotic Correction**

**Yu. Yu. Borshchev<sup>a</sup>, I. Yu. Burovenko<sup>a</sup>, S. M. Minasyan<sup>a</sup>, E. S. Protsak<sup>a</sup>,  
V. Yu. Borshchev<sup>b</sup>, O. V. Borshcheva<sup>a</sup>, I. G. Zubkov<sup>a</sup>, and M. M. Galagudza<sup>a, b, \*</sup>**

<sup>a</sup>Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: galagudza@almazovcentre.ru

**Aim:** to study myocardial resistance to ischemia-reperfusion and behavioral responses taking into account sex differences in rats in an experimental model of obesity and sys-

temic inflammatory response syndrome (SIRS). **Materials and methods:** experiments were performed on male and female Sprague-Dawley (SD) rats at the age of three months with primary visceral obesity (PVO). SIRS was modeled by a single rectal injection of acetic acid, followed by intragastrical administration of the antimicrobial drugs mixture (AMP) for 3 days. The other group of rats was treated orally with a mixture of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), at a CFU concentration of  $10^8$  per animal for 8 days after the simulation of SIRS. Behavioral tests "open field" (OFT), "elevated plus maze" (EPM), "light-dark box" (LDB) were performed alternately before the end of the experiment. At the end of the experiment, the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-2, leptin, lipopolysaccharide, transforming growth factor- $\beta$  and brain neurotrophic factor in the blood were assessed, hemodynamic parameters and myocardial resistance to ischemia-reperfusion were studied on an isolated heart model. **Results:** a higher food intake per 1 g of body mass and more pronounced thrombocytosis and granulocytosis were observed in the group of female rats, as compared to males after the SIRS modeling. Female rats had higher serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , leptin, interleukin-2, and lipopolysaccharide than males, as well as lower levels of transforming growth factor- $\beta$ . In male rats probiotic modulation of orientation and exploratory behavior and anxiety was observed whereas in female rats the rate of conditioned reflexes formation was corrected by probiotics. There were no significant differences in hemodynamic parameters, as well as in the size of the infarction between the studied groups. **Conclusion:** the data obtained indicate a significant role of sex hormones in the pathogenesis of SIRS, as well as a different response of females and males to probiotic therapy. The results generally show a higher intensity of compensatory-adaptive reactions and a greater efficiency of probiotic correction of SIRS in female rats compared to males. At the same time, the size of the infarction did not differ between females and males.

**Keywords:** systemic inflammatory response syndrome, behavioral responses, infarction size, gender, females, males, probiotics