

УДК 616.127-005.4:616-002-092:579.864]-092.9
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-28-36>

Влияние про- и метабитической формы штамма *Lactobacillus delbrueckii D5* на устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии в условиях системного воспалительного ответа у крыс

Борщев Ю.Ю.^{1,3}, Минасян С.М.^{1,2}, Семёнова Н.Ю.¹, Буровенко И.Ю.¹, Борщева О.В.¹, Гриценко Э.Ю.⁴, Шептицкий В.А.⁴, Суворов А.Н.^{5,6}, Галагудза М.М.^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) им. В.А. Алмазова
Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет (ПСПбГМУ)
им. акад. И.П. Павлова
Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8

³ Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Петрова
Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

⁴ Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко
Молдова, 3300, г. Тирасполь, ул. 25 Октября, 128

⁵ Институт экспериментальной медицины (ИЭМ)
Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ)
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 13б

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение эффекта лиофилизированного штамма *L. delbrueckii D5*, а также его инактивированной формы при внутрижелудочном введении на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП), маркеры воспаления и проницаемость эпителиального барьера кишки.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на самцах крыс стока Вистар с улучшенным конвенциональным статусом на модели синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). Ишемически-реперфузионное повреждение миокарда воспроизводили на изолированном сердце, перфузируемом по Лангендорфу.

Результаты. Отмечено значимое повышение уровня фактора некроза опухоли альфа, интерлейкина (ИЛ) 1β, ИЛ-6 и лактоферрина при ССВО. Введение как инактивированного, так и лиофилизированного штамма *L. delbrueckii D5* приводило к нормализации указанных изменений. Также отмечена нормализация повышенного при ССВО уровня липополисахарида в крови при введении как инактивированного, так и лиофилизированного штамма *L. delbrueckii D5*. Однако инактивированный штамм не оказывал влияния на размер инфаркта миокарда, который был увеличен при ССВО по сравнению с контролем, тогда как при введении лиофилизированной формы имелось значимое снижение размера инфаркта.

Заключение. Инактивированная культура *Lactobacillus delbrueckii D5* обладает выраженным противовоспалительным свойством, но не влияет на устойчивость миокарда к ИРП, в отличие от лиофилизированного штамма, что требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: миокард, ишемическое-реперфузионное повреждение, размер инфаркта, *Lactobacillus delbrueckii D5*, синдром системного воспалительного ответа, лейкоциты, цитокины, пробиотики

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

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 23-15-00139, <https://rscf.ru/project/23-15-00139>.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова (протокол ПЗ_23_9_ГалагудзаММ_V1 от 05.06.2023).

Для цитирования: Боршев Ю.Ю., Минасян С.М., Семёнова Н.Ю., Буровенко И.Ю., Борщева О.В., Гриценко Э.Ю., Шептицкий В.А., Суворов А.Н., Галагудза М.М. Влияние про- и метабиотической формы штамма *Lactobacillus delbrueckii D5* на устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии в условиях системного воспалительного ответа у крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(2):28–36. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-28-36>.

Effect of pro- and metabiotic *Lactobacillus delbrueckii D5* strain on myocardial resistance to ischemia – reperfusion injury in the rat model of systemic inflammatory response

Borshchev Yu.Yu.^{1,3}, Minasean S.M.^{1,2}, Semenova N.Yu.¹, Burovenko I.Yu.¹, Borshcheva O.V.¹, Gritsenko E.Yu.⁴, Sheptitsky V.A.⁴, Suvorov A.N.^{5,6}, Galagudza M.M.^{1,2}

¹ Almazov National Medical Research Center
2, Akkuratova Str., St. Petersburg, 197341, Russian Federation

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
6/8, Lva Tolstogo Str., St. Petersburg, 197022, Russian Federation

³ N.N. Petrov National Medical Research Center (NMRC) of Oncology
68, Leningradskaya Str., Pesochny Village, St. Petersburg, 197758, Russian Federation

⁴ Shevchenko Transnistria State University
128, October 25 Str., Tiraspol, 3300, Moldova

⁵ Institute of Experimental Medicine
12, Akademika Pavlova Str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation

⁶ St. Petersburg University
13b, Universitetskaya Emb., St. Petersburg 199034, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the effect of lyophilized *L. delbrueckii D5*, as well as its inactivated culture, during intragastric administration on myocardial resistance to ischemia – reperfusion injury (IRI), markers of inflammation, and intestinal epithelial permeability.

Materials and methods. The experiments were performed on male Wistar rats with a model of systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Myocardial IRI was reproduced on an isolated Langendorff heart.

Results. A significant increase in the levels of tumor necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, and lactoferrin in SIRS was revealed. The introduction of both inactivated and lyophilized culture of *L. delbrueckii D5* resulted in normalization of these changes. Normalization of the increased blood level of lipopolysaccharide in SIRS was also noted with the introduction of both inactivated and lyophilized *L. delbrueckii D5*. However, the inactivated culture had no effect on the myocardial infarct size, which was increased in the SIRS group compared to the controls, whereas the introduction of the lyophilized strain led to a significant decrease in this parameter.

Conclusion. The inactivated culture of *Lactobacillus delbrueckii D5* has a pronounced anti-inflammatory effect, but does not impact myocardial resistance to IRI, unlike the lyophilized strain, which requires further research.

Keywords: myocardium, ischemia – reperfusion injury, infarct size, *Lactobacillus delbrueckii D5*, systemic inflammatory response syndrome, leukocytes, cytokines, probiotics

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Science Foundation grant, project No. 23-15-00139, <https://rscf.ru/project/23-15-00139>.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Almazov National Medical Research Center (Protocol PZ_23_9_GalagudzaMM_V1 of 05.06.2023).

For citation: Borshchev Yu.Yu., Minasean S.M., Semenova N.Yu., Burovenko I.Yu., Borshcheva O.V., Gritsenko E.Yu., Sheptitsky V.A., Suvorov A.N., Galagudza M.M. Effect of pro- and metabiotic *Lactobacillus delbrueckii D5* strain on myocardial resistance to ischemia – reperfusion injury in the rat model of systemic inflammatory response. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(2):28–36. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-28-36>.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск сигнальных молекул, обеспечивающих повышение устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению (ИРП), представляет несомненный интерес для экспериментальной и клинической медицины в связи с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО). В последнее время в литературе появляются данные об уменьшении ИРП миокарда при индуцированных различными воздействиями изменениях состава кишечной микробиоты (КМБ). Попытки идентифицировать единственный молекулярный посредник, связывающий КМБ, иммунную и сердечно-сосудистую системы «суперорганизма», вероятнее всего, обречены на неудачу [1]. Учитывая бесконечное разнообразие состава кишечной микробиоты и ее участие во всех физиологических и патологических процессах макроорганизма, также маловероятной выглядит гипотеза об исключительных свойствах бактерии, определяющей здоровье организма-хозяина и его микробиоты. Наиболее вероятным условием формирования и поддержания здоровья представляется гармоничное сочетание ключевых сигнальных факторов иммунитета и параметров метаболизма в связи с обеспечением адекватных и сбалансированных отношений между организмом, потребляемым пищевым рационом и составом КМБ.

В соответствии с предыдущими результатами, полученными на разработанной нами модели ССВО на грызунах в рамках концепции пробиотик-индуцированной кардиопротекции, могут быть сделаны следующие промежуточные выводы. При ССВО, возникающем при сочетании первичного висцерального ожирения, антибиотик-индуцированного дисбиоза

и химически индуцированного колита, происходит снижение устойчивости миокарда к ишемическому реперфузионному повреждению [2], а введение некоторых пробиотических штаммов сопровождается уменьшением ИРП миокарда [3].

Помимо общепризнанных и установленных нами кардиотропных маркеров системного воспаления (фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), трансформирующий фактор роста бета (ТФР- β), интерлейкин (ИЛ) 1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, моноцитарный хемотаксический фактор 1 и др.), продуктов метаболизма (короткоцепочечные жирные кислоты, желчные кислоты), популяций лейкоцитов, в связи с изменениями состава КМБ [4], представляют интерес процессы изменения эндотелиальной и эпителиальной проницаемости и маркеры острой фазы воспаления, в частности гаптоглобин (Hr) и лактоферрин. Особый интерес представляет выяснение физиологических и молекулярных механизмов влияния КМБ и ее метаболитов на воспаление и устойчивость миокарда к ИРП. С целью определения перспективных мишеней и механизмов необходимо экспериментальное обоснование общих и специфических особенностей действия на макроорганизм живых и инактивированных штаммов, получивших название метабиотических [5].

В настоящей работе на ранее разработанной модели ССВО в условиях барьерного вивария на крысах стока Вистар с улучшенным конвенциональным статусом нами изучено влияние штамма *Lactobacillus delbrueckii D5* (ЛБД) и этой же инактивированной культуры (ИНК) на динамику массы тела животных, потребление корма и воды, гематологические, иммунологические параметры, гемодинамические характеристики и устойчивость миокарда к ИРП с

применением модели изолированного сердца. Рабочей гипотезой стало предположение об отличиях эффективности инактивированных микроорганизмов по сравнению с живой культурой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на самцах крыс стока Вистар с улучшенным конвенциональным статусом массой 320–370 г в соответствии с Директивой Европейского совета (86/609/ЕЕС) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными, по протоколу, утвержденному Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В.А. Алмазова. Моделирование ССВО подробно описано ранее [2].

Животные случайным образом распределялись в одну из пяти групп ($n = 10$ в каждой группе): 1) контроль (КТР): крысы получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*; 2) ССВО: в дополнение к стандартной диете крысы получали ежедневно *per os* в течение 28 сут по 2 г полиненасыщенных жиров и 1 г сахарозы, с последующим моделированием химически индуцированного колита. Для этого животным однократно ректально вводили 1 мл смеси 3%-го раствора уксусной кислоты и этанола. Начиная с этого дня, животным внутривенно вводили смесь антимикробных препаратов (АМП: амоксициллин, метронидазол и кларитромицин): 1 мл раствора АМП в суточной дозе по 15 мг каждого АМП на крысу в течение 3 сут и 1 мл физиологического раствора (ФР) в течение 8 сут; 3) ССВО + ЛБД – все манипуляции соответствовали описанным выше для группы ССВО, но вместо 1 мл ФР вводили 1 мл суспензии *L. delbrueckii D5*, в концентрации 10×8 КОЕ на одно животное; 4) ССВО + ИНК – крысам данной группы вводили 1 мл пробиотической суспензии *L. delbrueckii D5* после ее пастеризации при температуре 85–90 °С в течение 1 мин.

После завершения введения препаратов у крыс в условиях комбинированного наркоза (золетил 20 мг/кг, в/м, изофлуран 1,5–2%) после торакотомии извлекали сердце из грудной полости и подключали к модернизированному аппарату Лангендорфа. Перфузию осуществляли ретроградно через аорту оксигенированным буфером Кребса – Гензелейта при постоянном давлении 80 мм рт. ст. В течение всего эксперимента температура сердца и растворов поддерживалась на уровне 37 °С. В полость левого желудочка вводили полиэтиленовый баллон для регистрации давления в изоволюметрическом режиме. Величины диастолического и пульсового давления в левом желудочке регистрировали на персональном компьютере с помощью программы PhysExp 3.0. По

кривой давления в левом желудочке программным методом оценивали частоту сердечных сокращений (уд/мин). Также измеряли коронарный поток (КП) в мл/мин по скорости оттока перфузата из легочной артерии.

Протокол исследования включал следующие этапы: 1) контроль исходного состояния функциональных показателей после 10 мин стабилизационного периода; 2) индукция глобальной ишемии в течение 30 мин; 3) реперфузия через аорту оксигенированным буфером Кребса – Гензелейта в течение 60 мин со снятием показателей через каждые 15 мин. После завершения 60-минутной реперфузии осуществляли планиметрическую оценку размера инфаркта путем окраски срезов сердца трифенилтетразолием хлоридом [6].

Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, URIT Medical Electronic, Китай). Анализ состава лейкоцитов в крови в данной работе проведен на трех популяциях лейкоцитов: LYM (лимфоциты), MID (общее число моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток), GRAN (гранулоциты). Уровень липополисахарида (ЛПС), ТФР- β 1, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, гаптоглобина и лактоферрина оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай). На протяжении всего эксперимента ежедневно с 9.00 до 10.00 проводили оценку клинического статуса животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программного пакета Statistica 12.0. Статистический анализ дискретных значений проводился с использованием непараметрического *H*-критерия Краскела – Уоллиса для обнаружения статистически значимых различий, с последующим апостериорным сравнением с использованием *U*-критерия Манна – Уитни. В таблицах приведены значения медианы (*Me*) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{25\%}; Q_{75\%}$). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса тела, потребление воды и корма

Масса тела крыс в группе КТР в течение всего периода наблюдения в среднем увеличивалась на $1,25 \pm 0,33$ г/сут, тогда как в группах ССВО, ССВО + ЛБД и ССВО + ИНК наблюдали уменьшение массы тела животных на $3,63 \pm 1,21$; $3,18 \pm 0,95$ и $3,25 \pm 0,97$ г/сут соответственно ($p < 0,05$ в сравнении с группой КТР). Потребление воды за этот же период из расчета на 100 г массы тела в группе КТР составило $8,8 \pm 1,1$ мл/сут и $7,3 \pm 0,1$; $10,1 \pm 1,5$ и

9,3 ± 0,3 мл/сут для групп ССВО, ССВО + ЛБД и ССВО + ИНК соответственно. Потребление корма составило в этих группах 1,2 ± 0,2; 1,4 ± 0,3 и 1,5 ± 0,1 г/сут соответственно и было меньше в 2,8; 2,4 и 2,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой КТР (3,3 ± 0,4 г/сут).

Клинический анализ крови

Количество лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$ для всех популяций) в группе КТР составило 5,3 (5,2; 5,4), а в группах ССВО, ССВО + ЛБД и ССВО + ИНК – 7,9 (6,6; 10,1) ($p < 0,05$); 7,5 (5,3; 10,4) ($p < 0,05$) и 6,2 (5,8; 7,3) соответственно. Популяция гранулоцитов (GRAN) внесла основной вклад в увеличение количества лейкоцитов по отношению к КТР 2,6 (2,3; 2,8) в подопытных группах, соответственно, 5,9 (4,2; 6,8) ($p < 0,05$); 5,5 (4,8; 6,2) ($p < 0,05$) и 4,6 (4,3; 5,5) ($p < 0,05$). Значения в популяции MID составили для групп КТР, ССВО, ССВО + ЛБД и ССВО + ИНК, соответственно, 0,2 (0,2; 0,28); 0,4 (0,2; 0,5); 0,30 (0,2;

0,49) и 0,20 (0,2; 0,4), а в популяции LYM – 1,2 (1,1; 1,3); 1,6 (1,4; 2,0); 1,3 (0,9; 1,9) и 1,2 (1,1; 1,6) соответственно.

Иммунологические показатели

В данном исследовании отмечено значимое увеличение концентрации ЛПС в крови в группе ССВО по отношению к КТР более чем в 3 раза ($p < 0,05$), без увеличения в других группах. Уровни маркеров воспаления и гормонов представлены в табл. 1. В группе ССВО концентрация ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ТФР- β , Нр и ЛПС по отношению к КТР стала больше на 83, 108, 47, 94, 146 и 214% соответственно ($p < 0,05$). В группе ССВО + ИНК по отношению к группе ССВО отмечено уменьшение ТФР- β , лактоферрина и Нр на 63, 94 и а 117% соответственно ($p < 0,05$). В группе ССВО + ЛБД показатели всех анализов были близки контрольным значениям, за исключением значимого увеличения для лактоферрина на 133% ($p < 0,05$).

Таблица 1

| Результаты оценки уровня цитокинов, гаптоглобина, лактоферрина и липополисахарида в плазме крови, пг/мл, Me ($Q_{25\%}$; $Q_{75\%}$) | | | | |
|---|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| Показатель | КТР | ССВО | ССВО + ЛБД | ССВО + ИНК |
| ФНО- α | 10,4 (8,7; 11,4) | 19,0 (15,0; 21,5)* | 11,2 (10,0; 13,3)# | 14,8 (12,8; 14,6) |
| ИЛ-1 β | 4,6 (2,2; 4,9) | 9,6 (7,4; 10,2)* | 4,9 (4,3; 5,2) # | 6,6 (6,0; 7,6) |
| ИЛ-6 | 1,5 (1,4; 1,8) | 2,2 (2,0; 2,5)* | 1,3 (1,2; 2,5) | 1,4 (1,0; 2,1) |
| ТФР- β | 3,2 (2,5; 4,4) | 6,2 (5,1; 11,1)* | 4,5 (3,1; 7,3) | 3,8 (3,2; 4,9)# |
| Лактоферрин | 86 (58; 121) | 107 (90; 109) | 133 (119; 145)* | 55 (37; 63)# |
| Гаптоглобин | 31 (24; 37) | 76 (64; 102)* | 24 (22; 30)# | 35 (26; 40)# |
| ЛПС | 52 (42; 65) | 163 (91; 168)* | 60 (54; 71)# | 63 (50; 69)# |

* $p < 0,05$ по отношению к группе КТР, # $p < 0,05$ по отношению к группе ССВО.

Гистологическое исследование толстого кишечника

При гистологическом исследовании соответствующего участка толстой кишки у крыс группы КТР обнаружена нормальная гистоархитектоника ткани. В группе ССВО на слизистой толстой кишки в очаге воспаления (5–7 см от ануса) определяются обширные участки с язвами и эрозиями с гнойным экссудатом. Отмечается замещение слизистой оболочки и подслизистой основы грануляционной тканью, отек и сильно выраженная воспалительная инфильтрация, в составе которой преобладали лимфоциты, однако в довольно большом количестве присутствовали макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты и эозинофилы. Отмечено полнокровие сосудов микроциркуляторного русла и лимфатических сосудов. Мышечная оболочка расширена, определяется воспалительная инфильтрация разной степени выраженности. В дне язвенного дефекта определяются характерные изменения в виде чередования слоев

фибриноидного некроза, грануляционной и фиброзной ткани. Слизистая вокруг обширных язвенных дефектов изъязвлена, отмечается нарушение гистоархитектоники, выраженная воспалительная инфильтрация, некроз крипт более чем на 2/3.

В группах ССВО + ЛБД и ССВО + ИНК также отмечаются обширные язвенные дефекты, однако более выражено присутствуют признаки регенерации ткани, реэпителизация с краев язвенных дефектов до 40%, преобладание фибриноидного компонента, восстановление гистоархитектоники мышечного и подслизистого слоев, отсутствие слизисто-гнойного экссудата. В группе ССВО + ИНК отмечается организация поверхностных слоев язвенных дефектов с формированием незрелой соединительной ткани на месте грануляционной, уменьшается воспалительная инфильтрация. При замещении слизистого и подслизистого слоев грануляционной тканью встречаются признаки регенерации. В группе ССВО + ЛБД при аналогичных изменениях из предыдущего описания в некоторых

образцах, в краях язвенных дефектов обнаружена резпитализация однослойным кишечным эпителием, указывающая на ускоренные темпы регенерации.

Морфофункциональные характеристики изолированного сердца

Размер инфаркта в группе КТР составил 41% (38; 45), а в группе ССВО 54% (52; 57), что значительно больше ($p < 0,05$) по отношению к контролю. В группе ССВО + ЛБД размер инфаркта составил

42% (36;48), что значительно меньше, чем в группе ССВО. В группе ССВО + ИНК отмечена лишь тенденция уменьшения размера инфаркта относительно группы ССВО (47% (44; 58), $p = 0,6061$).

В табл. 2 приведены сведения о корреляционной связи между показателями изучаемых параметров и размером инфаркта миокарда.

На рисунке показаны значимые различия между данными размера инфаркта миокарда, ФНО- α , ИЛ-1 β , ТФР- β и Нр по группам.

Таблица 2

| Корреляционная связь по Спирмену между показателями (размер инфаркта, ФНО- α , ИЛ-1 β , ТФР- β , Нр и лактоферрин) в плазме крови у всех крыс в эксперименте, $p < 0,05$ | | | | | | |
|---|---------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|
| Показатель | ФНО- α | ИЛ-1 β | ТФР- β | Лактоферрин | Гаптоглобин | Размер инфаркта |
| ФНО- α , пг/мл | 1,0000 | 0,4570* | 0,2209 | -0,0269 | 0,3077 | 0,4654* |
| ИЛ-1 β , пг/мл | 0,4570* | 1,0000 | 0,3944* | -0,3455* | 0,4159* | 0,5063* |
| ТФР- β , пг/мл | 0,2209 | 0,3944* | 1,0000 | -0,0477 | 0,2638 | 0,3657* |
| Лактоферрин, пг/мл | -0,0269 | -0,3455* | -0,0477 | 1,0000 | -0,2164 | -0,2102 |
| Гаптоглобин, пг/мл | 0,3077 | 0,4159* | 0,2638 | -0,2164 | 1,0000 | 0,4244 |
| Размер инфаркта, % | 0,4654* | 0,5063* | 0,3657* | -0,2102 | 0,4244* | 1,0000 |

* $p < 0,05$ по отношению к группе КТР.

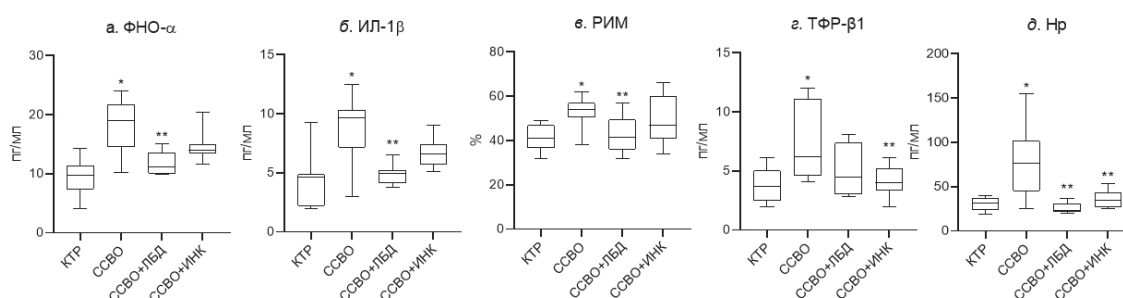


Рисунок. Показатели уровня ФНО- α (а), ИЛ-1 β (б), размера инфаркта (в), ТФР- β (з), Нр (д) в плазме крови: * $p < 0,05$ по отношению к группе КТР, ** $p < 0,05$ по отношению к группе ССВО

Ввиду ограниченности возможностей тонкой дифференциации лейкоцитов на субпопуляции и по зрелости можно косвенно утверждать, что при моделировании ССВО в увеличении представительства популяции GRAN основную роль в данном опыте играли нейтрофилы. В группе ССВО произошло уменьшение числа лимфоцитов и фракции средних лейкоцитов MID, включающей в себя моноциты, эозинофилы, базофилы и их предшественников. В группе ССВО + ИНК отмечены минимальные показатели MID и LYM. Введение активной и инактивированной культуры крысам с ССВО сопровождалось нормализацией общего количества лейкоцитов и уменьшением представительства LYM, GRAN и MID по сравнению с ССВО.

В группе ССВО при увеличении показателей ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, Нр в крови и при росте по-

пуляции GRAN наблюдается снижение субпопуляций LYM и MID, что указывает на причинную роль ССВО в отношении продукции и миграции лейкоцитов. Регуляция пролиферации и дифференцировки лимфоцитов находится под влиянием цитокинов, интенсивно образующихся на фоне воздействия различных антигенов инфекционной и неинфекционной природы лимфоцитами и моноцитами, в частности ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7. В группе ССВО отмечены дегенеративно-деструктивные изменения кишечной стенки с потерей барьерной функции при существенном увеличении уровня ЛПС в крови, что обеспечивает его триггерную роль в процессе запуска системного воспаления. Основной, но вероятно, не единственной причиной снижения уровня ЛПС в группах с пробиотической и метабиотической терапией по отношению к ССВО может являться

конкурентное снижение манифестации условно-патогенной микробиоты и (или) уменьшение проницаемости кишечной стенки для ЛПС. Каждый механизм, как по отдельности, так и в сочетании, может вносить решающий вклад в показатели эндотоксинеми, так как подавление фагоцитирующих и иммунокомпетентных клеток организма хозяина обнаруживается только у отдельных штаммов.

Накапливающиеся в последние годы данные свидетельствуют о важной роли кишечной микробиоты в поддержании избирательной проницаемости кишечного эпителия и предупреждении дисфункции клеточного барьера, приводящей к синдрому повышенной проницаемости кишечника, обеспечивающему неспецифический перенос провоспалительных антигенов, микробов и метаболитов из просвета кишечника в слизистую оболочку и кровотоки, что может являться причиной различных заболеваний, включая воспалительные заболевания кишечника и опухоли, ожирение, неалкогольную жировую болезнь печени, депрессию, нейродегенерацию, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет 1-го типа [7]. Представители нормальной микробиоты кишечника, очевидно, играют специализированную роль в поддержании целостности физического кишечного барьера, причем основным способом достижения этой цели является генерация ими микробных метаболитов и бактериальных компонентов [8].

Например, бутират, полученный в результате бактериальной ферментации пищевых волокон, усиливает экспрессию белков плотных контактов (ПК) – важнейших мультипротеиновых комплексов, регулирующих проницаемость кишечного барьера [9]. Такие микробные компоненты, как липопептиды, усиливают функцию ПК, стабилизируя уровни белков плотных контактов окклюдина-1 (ZO-1) и клаудина за счет активации протеинкиназы С при взаимодействии с Toll-подобными рецепторами (TLR) на эпителиальных клетках кишечника [10].

В связи с этим проведен ряд исследований *in vitro* [11–15] и *in vivo*, включая клинические испытания [16, 17] влияния штаммов пробиотических бактерий родов *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Streptococcus* на барьерную функцию кишечника, которые дали многообещающие результаты. Обнаружено, что применение пробиотиков заметно улучшает барьерную функцию кишечника, измеряемую величиной трансэпителиального электрического сопротивления (TEER), уровнями сывороточного зонулина, ЛПС, и способствует нормализации повышенной проницаемости кишечника, снижению воспалительных факторов, включая С-реактивный белок, ФНО-α и

ИЛ-6 в неблагоприятных условиях (бактериальные инфекции, окислительный стресс, диета с высоким содержанием жиров, алкоголь, хронические аллергии, дисбиоз), в частности, путем усиления функции ПК эпителиальных клеток кишечника, связанной с повышением синтеза окклюдина [18, 19].

Следует отметить, что более высокую эффективность в отношении поддержания барьерной функции кишечника и предотвращения синдрома повышенной кишечной проницаемости демонстрируют комплексные пробиотики по сравнению с одиночными штаммами. Таким образом, пробиотики могут иметь важное значение при лечении аутоиммунных и метаболических заболеваний за счет улучшения барьерной функции кишечника. Однако исчерпывающая оценка пробиотиков, регулирующих барьерную функцию кишечника при различных заболеваниях, до сих пор отсутствует.

Отмечена значимая обратная связь лактоферрина и прямая связь гаптоглобина со значением ИЛ-1β в группе ССВО + ЛБД при высокой концентрации лактоферрина. Наблюдались нормальные значения ИЛ-1β и Нр при нормальном размере инфаркта, что может указывать на наличие специфических свойств у активного штамма по сравнению с инактивированной формой.

В данной работе введение активной и инактивированной культуры равнозначно отразилось на изменении большинства исследованных показателей в крови, что указывает на молекулярную достаточность про- и метабиотика в данном случае. Однако при этом совершенно очевидно, что в случае, когда животные получали живые бактерии, у них достоверно возростала продукция лактоферрина при снижении продукции гаптоглобина, а также провоспалительных цитокинов до контрольных показателей. Эти тенденции подтвердили и достоверные отличия с размерами инфаркта у группы животных, получавших живые бактерии. Вероятно, что живые лиофилизированные лактобациллы, переходя в метаболически активное состояние, успевали модулировать иммунные реакции, приводя их к контрольным значениям. Полученные данные указывают на целесообразность применения пробиотикотерапии с использованием живых микроорганизмов при острых кардиологических патологических процессах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лактоферрин и гаптоглобин, как белки острой фазы воспаления, показали различный ответ в рамках про- и метабиотической модуляции на модели ССВО. Значения концентрации гаптоглобина в крови прямо ассоциированы со значениями липополиса-

хариды, а лактоферрина обратно коррелируют с изученными цитокинами и размером некроза миокарда.

В данной работе обращает на себя внимание синергичное изменение показателей ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и лактоферрина по группам, с их максимальным увеличением в группе ССВО, промежуточным в группе ССВО + ИНК и близкими значениями к контролю в группе ССВО + ЛБД. Учитывая ассоциативную связь размеров площади некроза миокарда с увеличением показателей для обозначенных маркеров в группах ССВО и ССВО + ИНК, при соответствующем уменьшении в КТР и ССВО + ЛБД, можно предположить наличие специфических свойств у живой пробиотической культуры и соответствующего механизма.

Остается открытым вопрос об информативности комбинации повышенных значений ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и лактоферрина в отношении снижения устойчивости миокарда к ИРП. В случае установления зависимости между данными маркерами и морфофункциональными показателями миокарда возможно таргетное исключение одного из факторов наиболее безопасным способом. Инактивированная культура *Lactobacillus delbrueckii D5* обладает выраженным противовоспалительным свойством без увеличения устойчивости к ИРП, в отличие от лиофилизированного штамма, что требует дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Zhang Y., Wang Y., Ke B., Du J. TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Transl. Res.* 2021;228:109–125. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.08.007.
- Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б., Минасян С.М., Борщев В.Ю., Семенова Н.Ю. и др. Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс. *Медицинская иммунология.* 2020;22(1):87–98. DOI: 10.15789/1563-0625-MOS-1839.
- Borshchev Y.Y., Burovenko I.Y., Karaseva A.B., Minasian S.M., Protsak E.S., Borshchev V.Y. et al. Probiotic therapy with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* results in infarct size limitation in rats with obesity and chemically induced colitis. *Microorganisms.* 2022;10(11):2293. DOI: 10.3390/microorganisms10112293.
- Карасёва А.Б., Буровенко И.Ю., Цапиева А.Н., Борщев Ю.Ю., Суворов А.Н., Галагудза М.М. Изменения состава кишечной микробиоты при моделировании системного воспалительного ответа у крыс разного возраста. *Университетский терапевтический вестник.* 2022;4(2):42–51. DOI: 10.56871/4633.2022.37.29.005.
- Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация.* 2020;2(3):233–243. DOI: 10.36425/rehab25811.
- Минасян С.М., Бадриханова Л.Р., Галагудза М.М., Курапеев Д.И. Сравнительное исследование защитного эффекта гипотермии, ишемического прекодиционирования и модифицированных кардиоплегических растворов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2008;2(26):72–78.
- Di Vincenzo F., Del Gaudio A., Petito V., Lopetuso L.R., Scaldaferri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern. Emerg. Med.* 2024;19(2):275–293. DOI: 10.1007/s11739-023-03374-w.
- Ghosh S., Ahmad R., Zeyaulah M., Khare S.K. Microbial nano-factories: synthesis and biomedical applications. *Front. Chem.* 2021;9:626834. DOI: 10.3389/fchem.2021.626834.
- Peng L., Li Z.R., Green R.S., Holzman I.R., Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* 2009;139(9):161901625. DOI: 10.3945/jn.109.104638.
- Cario E., Gerken G., Podolsky D.K. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology.* 2004;127(1):224–238. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.04.015.
- Yi H., Wang L., Xiong Y., Wang Z., Qiu Y., Wen X. et al. *Lactobacillus reuteri* LR1 improved expression of genes of tight junction proteins via the MLCK pathway in IPEC-1 cells during infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:6434910. DOI: 10.1155/2018/6434910.
- Zhao L., Xie Q., Etereri Evivie S., Liu D., Dong J., Ping L. et al. *Bifidobacterium dentium* N8 with potential probiotic characteristics prevents LPS-induced intestinal barrier injury by alleviating the inflammatory response and regulating the tight junction in Caco-2 cell monolayers. *Food Funct.* 2021;12(16):7171–7184. DOI: 10.1039/D1FO01164B
- Hsieh C.Y., Osaka T., Moriyama E., Date Y., Kikuchi J., Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol. Rep.* 2015;3(3):e12327. DOI: 10.14814/phy2.12327.
- Zhao X., Zhou J., Liang W., Sheng Q., Lu L., Chen T. et al. Probiotics mixture reinforces barrier function to ameliorate necrotizing enterocolitis by regulating PXR-JNK pathway. *Cell Biosci.* 2021;11(1):20. DOI: 10.1186/s13578-021-00530-7.
- Blackwood B.P., Yuan C.Y., Wood D.R., Nicolas J.D., Grothaus J.S., Hunter C.J. Probiotic *Lactobacillus* species strengthen intestinal barrier function and tight junction integrity in experimental necrotizing enterocolitis. *J. Probiotics Health.* 2017;5(1):159. DOI: 10.4172/2329-8901.1000159.
- Francavilla R., Miniello V., Magistà A.M., De Canio A., Bucci N., Gagliardi F. et al. A randomized controlled trial of *Lactobacillus GG* in children with functional abdominal pain. *Pediatrics.* 2010;126(6):e1445–1452. DOI: 10.1542/peds.2010-0467.
- Mujagic Z., de Vos P., Boekschoten M.V., Govers C., Pieters H.H., de Wit N.J. et al. The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double-blind placebo controlled trial. *Sci. Rep.* 2017;7:40128. DOI: 10.1038/srep40128.

18. Zheng Y., Zhang Z., Tang P., Wu Y., Zhang A., Li D. et al. Probiotics fortify intestinal barrier function: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Front. Immunol.* 2023;14:1143548. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1143548.
19. Cheng F.S., Pan D., Chang B., Jiang M., Sang L.X. Probiotic mixture VSL#3: An overview of basic and clinical studies in chronic diseases. *World J. Clin. Cases.* 2020;8(8):1361–1384. DOI: 10.12998/wjcc.v8.i8.1361.

Вклад авторов

Борщев Ю.Ю., Галагудза М.М., Суворов А.Н. – концепция и дизайн исследования. Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Минасян С.М., Борщева О.В., Семёнова Н.Ю., Гриценко Э.Ю., Шептицкий В.А. – сбор и обработка материала, статистическая обработка. Борщев Ю.Ю., Шептицкий В.А. – написание текста. Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Галагудза М.М. – редактирование рукописи.

Информация об авторах

Борщев Юрий Юрьевич – канд. биол. наук, зав. научно-исследовательским отделом токсикологии, ИЭМ, НМИЦ им. В.А. Алмазова; науч. сотрудник, лаборатория химиопрофилактики рака и онкофармакологии, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, niscon@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3096-9747>

Минасян Саркис Минасович – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, ИЭМ, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург, sarkis@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6382-5286>

Семёнова Наталья Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, НИО патоморфологии ИЭМ, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург, natyciel87@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-4069-0678>

Буровенко Инесса Юрьевна – мл. науч. сотрудник, НИО токсикологии, ИЭМ, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург, burovenko.inessa@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-6637-3633>

Борщева Ольга Викторовна – науч. сотрудник, НИО токсикологии, ИЭМ, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург, violga27@mail.ru

Гриценко Элла Юрьевна – соискатель, кафедра физиологии, Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко, г. Тирасполь, gritenco.ella@gmail.com

Шептицкий Владимир Александрович – д-р биол. наук, профессор зав. кафедрой, Приднестровский государственный университет им. Т.Г. Шевченко, г. Тирасполь, septitchi@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6306-7021>

Суворов Александр Николаевич – д-р мед. наук, член-корр. РАН, зав. отделом молекулярной микробиологии, ИЭМ; зав. кафедрой фундаментальной медицины и медицинских технологий, СПбГУ, г. Санкт-Петербург, alexander_suvorov1@hotmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2312-5589>

Галагудза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, член-корр. РАН, директор ИЭМ, НМИЦ им. В.А. Алмазова; профессор кафедры патофизиологии, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург, galagudza@almazovcentre.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5129-9944>

✉ **Буровенко Инесса Юрьевна**, burovenko.inessa@gmail.com

Поступила в редакцию 02.10.2023;
одобрена после рецензирования 20.11.2023;
принята к публикации 26.12.2023