

ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВОДОРОД СНИЖАЕТ СТЕПЕНЬ АЛЬТЕРАЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

А.В.Дерюгина, Д.А.Данилова

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород, РФ

Исследовано действие молекулярного водорода H_2 на содержание циркулирующих эндотелиальных клеток и макростологическое состояние сердца при моделировании хронической сердечной недостаточности у крыс. Ингаляцию 2% H_2 проводили многократно (по 40 мин в течение 5 сут) или однократно (40 мин). Молекулярный водород вызывал уменьшение количества циркулирующих эндотелиальных клеток в обеих группах, наиболее выраженное при многократном воздействии на 14-е сутки после моделирования патологии. Снижение числа циркулирующих эндотелиальных клеток при действии H_2 сопровождалось восстановлением структурированности миокарда и уменьшением его массы. Применение молекулярного водорода ограничивало повреждение эндотелиоцитов и приводило к улучшению состояния миокарда крыс, что позволяет рассматривать его в качестве средства, уменьшающего прогрессирование хронической сердечной недостаточности.

Ключевые слова: молекулярный водород; хроническая сердечная недостаточность; эндотелиоциты; миокард

Эндотелиальная дисфункция является одним из ключевых звеньев сердечно-сосудистого континуума и способствует развитию хронической сердечной недостаточности (ХСН) [1]. При развитии дисфункции эндотелия происходит нарушение равновесия между процессами, обеспечивающими сосудорасширяющее, антимиотогенное, антитромбогенное действие (эндотелийзависимые релаксирующие факторы) и сосудосуживающими, протромботическими, пролиферативными процессами (эндотелийзависимые суживающие факторы) [2]. Такие факторы риска ХСН, как дислипидемия, артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение и возраст, во многом реализуют своё патологическое влияние именно через эндотелиальную дисфункцию [3]. Обсуждается роль "системной воспалительной активации" эндотелия в

патогенезе и дестабилизации течения заболевания [4]. С другой стороны, нарушения регионарного кровообращения могут привести к дисфункции эндотелия [5]. Основные причины развития эндотелиальной дисфункции при ХСН связаны с длительно существующей гемодинамической перегрузкой приводящих артерий (высоким напряжением сдвига), гиперактивацией эндотелинообразования, симпатико-адреналовой системы и ряда других нейрогуморальных систем [6]. Важную роль в развитии эндотелиальной дисфункции играет оксидативный стресс [7].

Использование лечебных воздействий, прямо или косвенно влияющих на окислительный стресс, может быть одним из способов локальной и системной нормализации функции эндотелия. Показано, что молекулярный водород H_2 действует как терапевтический и профилактический антиоксидант путём избирательного снижения сильных окислителей, таких как гидроксильный радикал $\cdot OH$ и пероксинитрит

Адрес для корреспонденции: danilovad.a@mail.ru. Данилова Д.А.

DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-4-426-429

ONOO⁻ в клетках, и проявляет цитопротективное действие против окислительного стресса [8]. Предыдущее исследование показало, что использование ингаляции 2% H₂ оказывает ингибирующее действие на развитие окислительных процессов при моделировании ХСН [9]. При этом исследований по влиянию H₂ на эндотелиальную дисфункцию при ХСН в доступной нам литературе не обнаружено. Учитывая, что уровень десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в периферической крови является отражением системного поражения эндотелия [10], а дисфункция миокарда — маркер ХСН [11], целью исследования являлось изучение влияния молекулярного водорода на содержания ЦЭК в крови крыс и состояние миокарда при развитии ХСН.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали самцов крыс Вистар ($n=30$) массой 275.38 ± 7.35 г (SPF-виварий ЦГКЛЖ ННГУ). ХСН моделировали внутрибрюшинным введением 1% адреналина гидрохлорида и 5 Ед/кг окситоцина [12]; данный метод подтверждается патогномичными для ХСН клиническими (снижение физической активности, одышка, повышенное слюноотделение, вялость) и гистологическими (кариопикноз кардиомиоцитов, фиброз, перичеллюлярный отёк, дилатация сосудов микроциркуляторного русла) проявлениями.

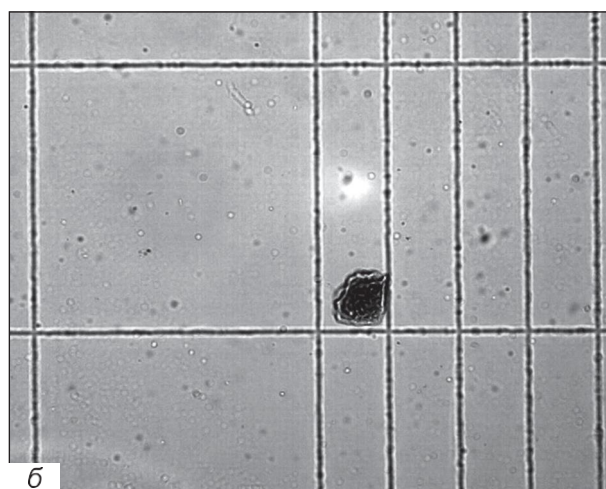
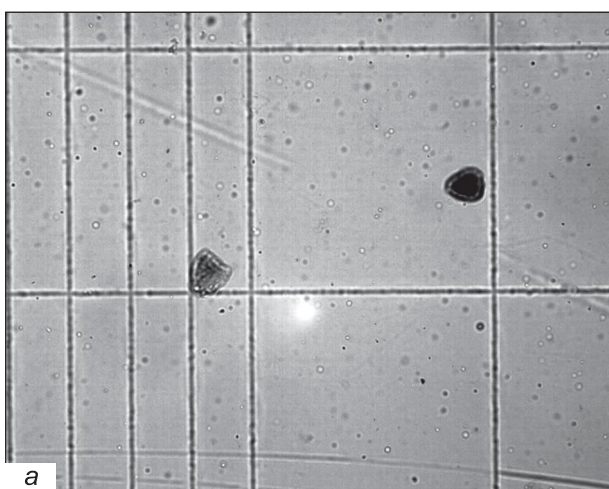
Все эксперименты разработаны в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях, и отвечают руководящим принципам исследования на жи-

вотных: отчётность об экспериментах *in vivo* (ARRIVE) [13]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ННГУ им. Н.И.Лобачевского (Протокол № 40 от 09 октября 2020 г.).

После моделирования ХСН животных рандомизировали на группы. Крысы 1-й группы ($n=10$) в течение 5 сут, начиная с 1-х суток после моделирования ХСН, помещали на 40 мин в вентилируемый бокс (ROX, 44×74×23 см; Tenma), куда подавалась воздушная смесь с 2% H₂. Крысы 2-й группы ($n=10$) на следующие сутки после моделирования ХСН получали однократно ингаляцию 2% H₂ в течение 40 мин, затем в течение следующих 4 сут помещались в бокс, куда подавали воздух на 40 мин. Крысы 3-й группы (контроль, $n=10$) помещали в бокс, куда в течение 5 сут после моделирования ХСН подавали воздух на 40 мин. За физиологическую норму принимали показатели интактных животных. Кровь брали из подъязычной вены на 1, 3, 7 и 14-е сутки после моделирования ХСН.

H₂ получали с помощью водородного генератора "Спутник-3" (поставщик Водород-помогает.рф). Содержание H₂ контролировали газоанализатором взрывоопасных и токсичных газов и паров "Водород (H₂)" ("Сигнал-4").

Изменения количества эндотелиоцитов определяли методом морфологической идентификации ЦЭК [14]. Метод основан на изоляции десквамированных эндотелиоцитов вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов адреналином. Выделенные эндотелиоциты подсчитываются в счётной камере с помощью светового микроскопа после предварительного окрашивания клеток метиленовым синим (рисунок).



Десквамированные эндотелиоциты в камере Горяева (а, б). Окрашивание метиленовым синим, световая микроскопия, ×600.

Макрогистологическое исследование состояния миокарда и массу сердец анализировали во всех исследуемых группах на 15-е сутки после моделирования ХСН.

Полученные данные статистически обрабатывали в программах Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.) и Microsoft Excel методами одномерной статистики. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Изучение статистических закономерностей в связи с нормальным распределением признаков проводили по t критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После моделирования ХСН количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток значительно превышало физиологический уровень. При использовании ингаляций H_2 в исследуемых группах наблюдалось снижение ЦЭК на всех этапах наблюдения. Наиболее выраженные изменения выявлялись при многократном действии H_2 на фоне ХСН. Минимальный уровень ЦЭК регистрировался при многократном использовании H_2 на 14-е сутки после моделирования ХСН (табл. 1).

При макроскопическом исследовании миокарда крыс на 15-е сутки после моделирования ХСН (контроль) отмечалась свободная перикардальная полость, без спаек, с умеренным содержанием перикардальной жидкости. Эпикард гладкий, тусклый, влажный, с выраженным слоем эпикардальной клетчатки; рыхлый краснокоричневый миокард; гладкий эндокард, не

однотонный; папиллярные мышцы, сухожильные хорды, а также клапаны сердца без видимых изменений. Камеры сердца умеренно расширены, содержат жидкую кровь. Масса сердец была увеличена на 29% относительно интактного контроля. Миокард интактных крыс характеризовался свободной перикардальной полостью, без спаек. Гладкий, блестящий, влажный эпикард с умеренным слоем эпикардальной клетчатки; плотный красный миокард, блестящий, гладкий эндокард; папиллярные мышцы, сухожильные нити, а также клапаны сердца без видимых изменений. Камеры сердца не расширены, содержат жидкую кровь. Масса сердца составляла 1.39 ± 0.02 г ($0.51 \pm 0.03\%$ относительно массы животного — 275.38 ± 7.35 г.).

Сердца крыс на фоне однократного применения H_2 значительно не отличались от контрольных, в то время как при многократных ингаляциях не отмечалось наличия перикардальной жидкости, а миокард был красного цвета, приближающийся по структуре к состоянию миокарда интактных крыс. При использовании H_2 масса сердец снижалась и значимо отличалась от таковой в контроле (табл. 2).

Таким образом, использование H_2 при ХСН снижало количество ЦЭК, что сочеталось с уменьшением повреждения миокарда. По-видимому, антиоксидантные свойства H_2 помогают нейтрализовать агрессивные радикалы, которые приводят к повреждению клеток [15], и обеспечить защиту эндотелия и миокарда. Кроме того, благодаря восстановлению целостности эндотелиальной прослойки улучшается проницаемость посредством комбинации трансцеллюлярных или парацеллюлярных путей, налаживается

Таблица 1. Содержание ЦЭК в исследуемых группах (количество клеток в 100 мкл крови; $M \pm m$)

Группа	Срок исследования, сутки			
	1-е	3-и	7-е	14-е
1-я (курс ингаляций 2% H_2)	$203.00 \pm 13.27^*$	$108.73 \pm 14.07^{**}$	$90.22 \pm 12.82^+$	$69.33 \pm 10.88^+$
2-я группа (ингаляция 2% H_2)	$188.00 \pm 10.74^{**}$	$154.42 \pm 3.32^{**}$	$131.86 \pm 6.94^{**}$	$125.00 \pm 2.86^{**}$
3-я (ХСН-контроль)	$205.60 \pm 5.56^*$	$186.56 \pm 4.01^*$	$173.50 \pm 6.94^*$	$182.67 \pm 5.93^*$

Примечание. $p \leq 0.05$ по сравнению *с физиологической нормой, *с ХСН-контролем. Показатели интактных животных (физиологическая норма): 84.36 ± 7.18 .

Таблица 2. Масса сердца крыс на 15-е сутки после моделирования ХСН ($M \pm m$)

Группа	Абсолютная масса сердца, г	Масса крыс, г	Масса сердца/масса тела, %
1-я (курс ингаляций 2% H_2)	1.75 ± 0.03	278.0 ± 11.6	$0.59 \pm 0.05^*$
2-я (ингаляция 2% H_2)	1.79 ± 0.04	279.25 ± 13.52	0.64 ± 0.02
3-я (ХСН-контроль)	1.73 ± 0.02	264.67 ± 7.31	0.65 ± 0.02

Примечание. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

баланс между выполняемыми разнонаправленными функциями: синтезом про- и противовоспалительных факторов, вазодилатирующих и вазоконстриктивных веществ, про- и антиагрегантов, про- и антикоагулянтов, про- и антифибринолитиков, факторов пролиферации и ингибиторов роста [5], эндотелиоциты сохраняют способность к синтезу веществ, регулирующих сосудистый тонус, АД и сократительную активность сердца [2]. Данные процессы направлены на нормализацию работы сердечно-сосудистой системы, что позволяет нивелировать прогрессирование ХСН. Таким образом, H_2 в качестве безопасного антиоксиданта может ограничивать развитие ХСН за счёт уменьшения дисфункции сосудистого эндотелия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Maliukova N.G.* Interrelation between lipid peroxidation and indices of hemocoagulation in patients with chronic heart failure resulted from ischemic heart disease // *Lik. Sprava*. 2007. N 1-2. P. 32-35.
2. *Balistreri C.R.* Promising strategies for preserving adult endothelium health and reversing its dysfunction: from liquid biopsy to new omics technologies and noninvasive circulating biomarkers // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, N 14. ID 7548. doi: 10.3390/ijms23147548
3. *Процаев К.И., Ильницкий А.Н., Бессарабов В.И., Павлова Т.В., Кветная Т.В., Болховитина О.А., Позднякова Н.М.* Молекулярные основы развития и прогрессирования хронической сердечной недостаточности в пожилом и старческом возрасте // *Мол. мед.* 2012. № 6. С. 60-63.
4. *Coll B., Alonso-Villaverde C., Joven J.* Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker? // *Clin. Chim. Acta*. 2007. Vol. 383, N 1-2. P. 21-29. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.019
5. *Мельникова Ю.С., Макарова Т.П.* Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней // *Казанск. мед. журн.* 2015. Т. 96, № 4. С. 659-665. doi: 10.17750/KMJ2015-659
6. *Магдалиц Т.И.* Дисфункция эндотелия при хронической сердечной недостаточности и влияние на нее ингибиторов ренин-ангиотензиновой системы // *Вестник Харьковск. нац. ун-та им. В.Н.Каразина. Сер. Медицина*. 2005. № 10. С. 81-85.
7. *Higashi Y., Noma K., Yoshizumi M., Kihara Y.* Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases // *Circ. J.* 2009. Vol. 73, N 3. P. 411-418. doi: 10.1253/circj.cj-08-1102
8. *Ning Y., Shang Y., Huang H., Zhang J., Dong Y., Xu W., Li Q.* Attenuation of cigarette smoke-induced airway mucus production by hydrogen-rich saline in rats // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 12. ID e83429. doi: 10.1371/journal.pone.0083429
9. *Дерюгина А.В., Данилова Д.А., Скокова А.А., Бричкин Ю.Д., Пичугин В.В., Медведев А.П., Рязанов М.В., Федоров С.А.* Динамика метаболических и окислительных показателей эритроцитов при использовании молекулярного водорода в терапии хронической сердечной недостаточности // *Бюл. exper. биол. и мед.* 2022. Т. 173, № 5. С. 567-571. doi: 10.47056/0365-9615-2022-173-5-567-571
10. *Киселева Н.И.* Циркулирующие в крови эндотелиальные клетки как маркер повреждения эндотелия при беременности, осложненной гестозом // *Вестник Витебск. гос. мед. ун-та*. 2007. Т. 6, № 1. С. 119-125.
11. *Статкевич Т.В., Митьковская Н.П., Балши Е.М., Ромбальская А.Р., Петрова Е.Б., Моклая Е.В., Левкович И.Э.* Тромбоэмболия легочной артерии при наличии синдрома хронической сердечной недостаточности: особенности структурно функционально-го состояния сердечно-сосудистой системы. // *Сиб. мед. журн. (Томск)*. 2020. Т. 35, № 2. С. 114-122. doi: 10.29001/2073-8552-2020-35-2-114-122
12. *Бренчагов А.В., Замотаева М.Н., Лузина Е.А., Зайцева Е.Н., Пижамова В.В.* Исследование новых цитопротекторов при хронической сердечной недостаточности у крыс // *Рос. кардиол. журн.* 2020. Т. 25, № S2. С. 39-40.
13. *Percie du Sert N., Hurst V., Ahluwalia A., Alam S., Avey M.T., Baker M., Browne W.J., Clark A., Cuthill I.C., Dirnagl U., Emerson M., Garner P., Holgate S.T., Howells D.W., Karp N.A., Lazic S.E., Lidster K., MacCallum C.J., Macleod M., Pearl E.J., Petersen O.H., Rawle F., Reynolds P., Rooney K., Sena E.S., Silberberg S.D., Steckler T., Würbel H.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research // *PLoS Biol.* 2020. Vol. 18, N 7. ID e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410
14. *Петрищев Н.Н., Беркевич О.А., Власов Т.Д., Волкова Е.В., Зуева Е.Е., Мозговая Е.В.* Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови // *Клин. лаб. диагност.* 2001. № 1. С. 50-52.
15. *Kessler T., Zhang L., Liu Z., Yin X., Huang Y., Wang Y., Fu Y., Mayr M., Ge Q., Xu Q., Zhu Y., Wang X., Schmidt K., de Wit C., Erdmann J., Schunkert H., Aherrahrou Z., Kong W.* ADAMTS-7 inhibits re-endothelialization of injured arteries and promotes vascular remodeling through cleavage of thrombospondin-1 // *Circulation*. 2015. Vol. 131, N 13. P. 1191-1201. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014072