
МЕТОДИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

**КОМБИНАЦИЯ *in vitro* и *in vivo* ПОДХОДОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ
МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА У КРЫС
С РЕНОВАСКУЛЯРНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

© 2025 г. А. В. Макеева¹, М. М. Артемьева¹, Д. А. Адашева¹, В. Е. Шein¹,
Н. А. Медведева¹, Д. В. Серебряная^{1, 2, *}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт нейронаук и нейротехнологий Российского национального исследовательского
медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

*E-mail: dariaserebryanaya@gmail.com

Поступила в редакцию 04.06.2025 г.

После доработки 24.07.2025 г.

Принята к публикации 30.07.2025 г.

Гипертрофические изменения миокарда желудочков сердца сопровождают большинство сердечно-сосудистых заболеваний и являются серьезным фактором риска внезапной смерти. На сегодняшний день разработан широкий спектр *in vitro* и *in vivo* моделей гипертрофии, однако ни одна из них не позволяет исследовать единовременно как биохимические, так и физиологические аспекты ее патогенеза. В настоящей работе предложен метод на основе индукции гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ), возникающей в результате реноваскулярной гипертензии у крыс, с последующим выделением кардиомиоцитов из сердец. В исследование было взято 68 крыс (32 крысы типа 1П1К, 16 крыс типа 1П, 20 крыс типа ЛО). Для развития ГЛЖ у крыс “одна почка одна клипса” (1П1К) левая почка удалялась, а на почечную артерию правой почки накладывалась клипса для ограничения кровотока. У группы крыс “одна почка” (1П) удаляли левую почку, тогда как правая оставалась интактной, а у ложнoperированных крыс (ЛО) проводили вскрытие брюшной полости с последующим наложением швов без каких-либо манипуляций с почками. Две последние группы использовались как контрольные. Через 1.5 месяца масса левого желудочка у крыс 1П1К превышала массу левого желудочка у контрольных групп в 1.2 раза, а артериальное давление у группы 1П1К относительно 1П и ЛО групп возрастало в 1.4 раза. У крыс 1П1К относительно контрольных групп наблюдалось повышение концентрации мочевины в крови и в моче примерно в 1.4 раза, а также усиление почечной экскреции, оцененной по клиренсу креатинина, в 1.5 раза. Концентрация натрийуретического пептида В типа (BNP) в сыворотке крови у группы 1П1К превышала таковую у контрольных групп в 2 раза. После индукции ГЛЖ из сердец контрольных и гипертрофированных крыс были получены первичные культуры кардиомиоцитов. Концентрация BNP в кондиционированной среде первичной культуры желудочковых кардиомиоцитов крыс 1П1К была выше, чем в контрольных группах, в 3.4 раза. Таким образом, было показано, что кардиомиоциты, выделенные из крыс группы 1П1К, сохраняют гипертрофический фенотип, а данный комбинированный подход можно использовать для исследования сердечной гипертрофии *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания, гипертрофия, миокард, реноваскулярная гипертензия, почечная артерия, кардиомиоциты, натрийуретический пептид В типа

DOI: 10.7868/S2658655X25100074

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной летального исхода и инвалидизации населения в мире и представляют собой серьезную проблему для современного здравоохранения [1]. Большинство ССЗ сопровождается развитием такого патологического состояния, как гипертрофия миокарда. Гипертрофическим изменениям в сердце могут подвергаться как предсердия, так и желудочки. Основные ССЗ ассоциированы в основном с развитием желудочковой гипертрофии, тогда как гипертрофия предсердий встречается гораздо реже [2]. Левожелудочковая гипертрофия в 30% случаев ассоциирована с артериальной гипертензией [3]. Гипертрофия представляет собой утолщение стенки миокарда, возникающее как адаптивная реакция на различные стрессовые воздействия с целью улучшения работы сердечной мышцы и обеспечения организма кислородом [4]. Гипертрофию принято подразделять на физиологическую и патологическую. Физиологическая гипертрофия развивается в условиях повышенной потребности организма в кислороде, например при повышенной физической нагрузке или при беременности [5, 6]. В случае продолжительных хронических патологических воздействий, например, таких как повышенное давление или различные ССЗ, физиологическая гипертрофия трансформируется в патологическую, чтобы нормализовать функционирование сердца и обеспечение тканей кислородом [7]. Желудочковая гипертрофия развивается практически при всех известных на сегодняшний день ССЗ – при сердечной недостаточности, после перенесенного инфаркта миокарда, при врожденных и приобретенных пороках сердца, а также при различных формах кардиомиопатий. Наличие желудочных гипертрофических изменений в миокарде является серьезным фактором риска внезапной смерти [7].

На клеточном уровне патологическая гипертрофия выражается в так называемом ремоделировании кардиомиоцитов – увеличении размеров клеток, интенсификации белкового синтеза, формировании высокоупорядоченных саркомеров, а также в изменении картины экспрессионного профиля в сторону, характерную для неонатальных кардиомиоцитов [8]. При этом пролиферативная активность клеток не меняется. Среди возможных причин возникновения гипертрофии выделяют воздействие механического стресса [9, 10] и различных ростовых агентов, таких как инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) или трансформирующий фактор роста beta (TGF- β) [11]. Патологическая гипертрофия, сопровождающая ССЗ, практически всегда связана с хроническими воспалительными процессами в сердечной мышце [12]. При этом в миокарде обнаруживаются высокие концентрации провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (TNF α), а также IL-1 β , IL-6. Показано, что данные агенты через активацию сигнального пути NFкappa-B также могут стимулировать развитие гипертрофии. Кроме этого, прогресс патологической гипертрофии может быть индуцирован активными формами кислорода, которые через ряд сигнальных каскадов, например МАРК и РКС-индукционных, активируют гипертрофическую транскрипционную программу клетки [13, 14]. Показано, что при патологической гипертрофии количество функционально активных кардиомиоцитов в сердце снижается [15].

Ввиду важности гипертрофических изменений в левом желудочке в патогенезе ССЗ исследование молекулярных механизмов их развития на *in vitro* и *in vivo* моделях представляет собой крайне актуальную задачу. Следует отметить, что каждая из моделей исследования обладает как возможностями, так и ограничениями, и использование ни одной из них не является полным отражением процессов, происходящих при гипертрофии, хотя существуют модели, максимально приближенные к физиологическим условиям. *In vitro* модели основаны на индукции гипертрофии в клеточных культурах кардиомиоцитов под действием специальных агентов. Такие модели используют для идентификации и исследования различных сигнальных путей, вовлеченных в развитие гипертрофического ответа. Основная проблема в данном случае заключается

в невозможности получения полностью кардиоспецифичной клеточной линии. Большинство подобных исследований проводятся с использованием первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов крыс [16]. Эти клетки делятся небольшое количество раз и могут находиться в здоровом состоянии в культуре до одной недели. В данном случае культура имеет смешанный характер и содержит значительное количество примесных фибробластов. Для моделирования гипертрофии *in vitro* также используют кардиомиоциты, полученные из сердец взрослых крыс, и кардиомиоциты, индуцированные из плuriпотентных стволовых клеток (iPSC), которые довольно значительно отличаются от зрелых кардиомиоцитов миокарда по организации саркомера и сократимости [17]. При обработке такими агентами, как изопротеренол, фенилэфрин, агиотензин II и эндотелин-1, кардиомиоциты в таких культурах увеличиваются в размерах, в них возрастает общее количество синтезированного белка и общая экспрессия генов приобретает профиль, характерный для гипертрофических изменений [18–20]. *In vivo* модели гипертрофии наиболее приближены к реальной физиологической картине, так как в данном случае индукцию гипертрофических изменений вызывают в интактном животном. Однако данные модели не позволяют исследовать механизмы развития гипертрофии на молекулярном уровне. Техники моделирования гипертрофии *in vivo* включают в себя непосредственное вмешательство в сердечно-сосудистую систему для индукции гипертензии с последующей гипертрофией (перегрузка давлением, перегрузка объемом, ишемия или инфаркт миокарда) [21, 22].

Одним из наиболее распространенных подходов для моделирования левожелудочковой гипертрофии *in vivo* является модель реноваскулярной гипертензии (РВГ). Самой показательной является модель с одной почкой и одной клипсой (1П1К), при которой удаляется одна почка и зажим помещается на почечную артерию оставшейся почки. В данном случае РВГ является формой гипертензии, которая зависит от ренин-агиотензиновой системы только в начале заболевания. Показано, что механизм развития РВГ запускается при сужении просвета приносящей почечной артерии не менее чем на 70–80% [23]. Считается, что важную роль в увеличении системного артериального давления и частоты сердечных сокращений играет увеличение симпатической активности [24].

РВГ сопровождается развитием гипертрофии миокарда за счет поперечного увеличения кардиомиоцитов и возникновением интерстициального фиброза сердца, особенно вокруг коронарных артерий [25]. Данная модель позволяет исследовать физиологические изменения, происходящие при развитии артериальной гипертензии у крыс, сопряженной как с почечной, так и с сердечной недостаточностью.

Таким образом, моделирование гипертрофии на клеточных культурах кардиомиоцитов с использованием различных агентов (эндотелин-1, норадреналин) *in vitro* легче осуществить технически, однако результаты с их использованием не всегда соответствуют реальной картине при гипертрофических изменениях миокарда. *In vivo* модели гипертрофии позволяют получить информацию о различных процессах, протекающих в сердечной мышце на физиологическом уровне, но исследования процессов на молекулярном уровне с использованием данных подходов затруднены. В связи с этим совмещение *in vivo* и *in vitro* техник моделирования гипертрофии и разработка модельной системы, использование которой, с одной стороны, позволило бы оценить физиологические параметры сердечно-сосудистой системы у животных с ГЛЖ сердца, а с другой стороны – исследовать различные молекулярные процессы на клеточном уровне, является подходом, расширяющим возможности изучения гипертрофии. Однако на сегодняшний день большинство исследований гипертрофии осуществляется с использованием одного типа модельных систем, а в тех в работах, где применяется комбинированный подход, эксперименты *in vivo* и *in vitro* проводят независимо, что не позволяет проследить развитие гипертрофии на физиологическом и молекулярном уровне в едином организме [26]. Поэтому разработка подхода, совмещающего создание *in vivo* модельной системы левожелудочковой гипертрофии миокарда с получением и оценкой культуры

гипертрофированных кардиомиоцитов из сердец крыс *in vitro*, и являлась целью данной работы. Данная технология, как нам кажется, позволит изучить механизмы патогенеза гипертрофии более полно, поскольку появится возможность исследования патологического состояния на разных уровнях организации в едином модельном объекте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все использованные реагенты общего назначения имели аналитическую чистоту и были приобретены в фирмах Sigma (США), "Хеликон" (Россия); расходные материалы из лабораторного и культурального пластика были приобретены в фирмах "ПанЭко" (Россия) и "Хеликон". Наборы для измерения концентрации ионов и метаболитов в биологических жидкостях были приобретены в "Ольвекс Диагностикум" (Россия). Анти-тела для иммунохимических работ были приобретены в компании Hytest (Финляндия) и Thermo Fischer (США). Дизайн исследования представлен на рис. 1.

Физиологические и аналитические методы. Исследование проводили на самцах линии Вистар, массой тела 250–300 г, полученных из вивария НИИ общей патологии и патофизиологии (Москва, Россия). При содержании крыс соблюдались условия 12-часового светового дня, со свободным доступом к воде и пище, при контроле влажности и температуры. Эксперименты начинали не ранее чем через 7 дней после доставки животных.

Проведение операций для моделирования реноваскулярной гипертензии. Для экспериментов животных разбивали на три группы: экспериментальную 1П1К (одна почка, одна клипса) и две контрольные – 1П (одна почка) и ложнопротивовенные (ЛО). Моделирование РВГ у группы 1П1К проводили посредством удаления правой почки совместно с установкой серебряной клипсы (0.26 мм) на левую почечную артерию. Для контрольной группы 1П удаляли правую почку, а левую оставляли интактной. В группе крыс ЛО проводили ложную операцию, оставляя обе почки интактными [27]. После операции животных помещали в индивидуальные клетки с чистыми опилками, доступом к корму и воде *ad libitum*. В течение последующих трех дней крысам вводили ципрофлоксацин (Ciprinol® 5 мг/кг, 2 мг/мл в сутки) внутрибрюшинно, а также следили за терморегуляцией и производили инъекции глюкозы и физиологического раствора.

Оценка динамики массы тела у крыс. Перед экспериментом всех крыс взвешивали и разделяли на группы так, чтобы средняя масса тела во всех группах была одинаковой.

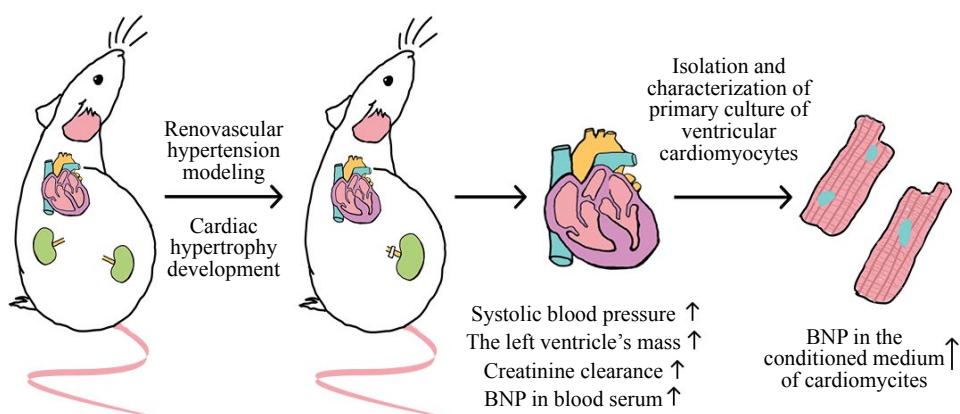


Рис. 1. Дизайн исследования.

На протяжении всего эксперимента животных еженедельно взвешивали для оценки общего состояния после операции. Также животных взвешивали перед и после посадки в метаболические клетки. За исходное значение массы тела крысы брали этот показатель непосредственно перед операцией.

Оценка динамики систолического артериального давления у крыс. Для оценки степени развития гипертензии измеряли систолическое артериальное давление (САД) пletизмографическим методом “с хвоста” при помощи программного обеспечения Power Graph и тензометрического датчика еженедельно в течение 6 недель после операции. За контрольную точку брали значение, измеренное у крыс за 2–3 дня до операции. Перед измерением САД крысы подвергались умеренному тепловому воздействию в течение 10 мин. Затем крысу помещали в плексигласовый реестрейнер для иммобилизации. Регистрацию САД проводили при помощи манжеты, надетой на основание хвоста крысы и соединенной с манометром, и тензометрического датчика (Россия). Результаты 5–6 измерений для каждой крысы усредняли.

Сбор мочи в метаболических клетках для оценки функций почки по биохимическим показателям. Каждые две недели животных взвешивали и помещали на 23 ч в чистые сухие метаболические клетки Tecniplast (Италия) для определения объема суточной мочи и суточного потребления жидкости, при этом животных лишали коры, но доступ к воде был неограничен. Пробы суточной мочи объемом 1 мл отбирали для дальнейшего измерения содержания креатинина и ионов; образцы замораживали и хранили при –20 °C.

Сбор крови для оценки функции почки по биохимическим показателям и определения концентрации диагностического маркера гипертрофии миокарда. После посадки в метаболические клетки, в течение шести недель после операции, каждые две недели у крыс проводили отбор крови. После умеренного теплового воздействия крысу фиксировали в плексигласовом реестрейнере для иммобилизации и отбирали в пробирку 1 мл крови из хвостовой вены при помощи медицинского шприца. Для полного свертывания крови после ее сбора пробирки держали 30 мин при комнатной температуре, затем еще 30 мин в холодильнике при 4 °C, после чего кровь центрифугировали при 500 g. Супернатант (сыворотку) отбирали, разделяли на аликовты по 100 мкл, замораживали и хранили при –20 °C.

Морфометрия органов. По прошествии 6 недель после индукции гипертензии у части животных проводили морфометрию органов. Крысам вводили уретан в дозе 1,2 г/кг и после того, как наркоз подействовал, декапитировали. Далее извлекали органы для морфометрии: измеряли массу сердца и его отделов (предсердия, левый желудочек, правый желудочек и межжелудочковая перегородка), а также массу легких и почек. На основе полученных данных рассчитывали коэффициенты выраженности гипертрофии левого желудочка. Коэффициент гипертрофии рассчитывали делением массы левого желудочка на массу сердца и выражали в процентах.

Биохимические и культурально-биологические методы

Определение концентрации креатинина в сыворотке крови и моче крыс. Для оценки функции почек проводили измерение такого показателя, как клиренс креатинина. Содержание креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе при помощи набора реагентов “Креатинин-Ольвекс” (Россия). Интенсивность окраски реакционной среды считали пропорциональной концентрации креатинина в пробе и измеряли фотометрически при длине волны 505 нм на мультимодальном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия). Клиренс креатинина (КК) вычисляли по формуле $KK = Ucr \times V / Scr$, где КК – клиренс креатинина, V – объем суточного мочеотделения, Ucr – концентрация креатинина в моче, Scr – концентрация креатинина в сыворотке крови.

Определение концентрации мочевины в сыворотке крови и моче крыс. Содержание мочевины в моче и сыворотке крови определяли фенол-уреазным гипохлоритным методом при помощи набора реагентов “Мочевина-Ольвекс”. Интенсивность окраски реакционной среды считали пропорциональной концентрации мочевины в пробе и измеряли фотометрически при длине волны 540 нм на мультиmodalном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия).

Определение концентрации натрия в сыворотке крови и моче крыс. Содержание натрия в моче и сыворотке крови крыс определяли колориметрическим методом при помощи набора реагентов “Натрий-Ольвекс”. Интенсивность окраски реакционной среды считали обратно пропорциональной содержанию натрия в пробе и измеряли фотометрически при длине волны 405 нм на мультиmodalном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH).

Определение концентрации калия в сыворотке крови и моче крыс. Содержание калия в моче и сыворотке крови определяли турбидиметрическим методом при помощи набора реагентов “Калий-Ольвекс”. Интенсивность мутности суспензии считали пропорциональной концентрации калия в пробе и измеряли фотометрически при длине волны 540 нм на мультиmodalном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH).

Извлечение и перфузия сердца взрослых крыс по Лангendorфу. По прошествии шести недель после моделирования реноваскулярной гипертензии у части животных извлекали сердца для выделения первичных культур желудочковых кардиомиоцитов. 24-луночные планшеты и конфокальные чашки заранее покрывали раствором фибронектина (40 мкг/мл, 250 мкл в лунку) и ожидали полимеризации подложки в течение ночи при 4 °C. Непосредственно перед началом выделения, а также во время выполнения перфузии все растворы нагревали на водяной бане до 37 °C и продували карбогеном (95% O₂, 5% CO₂). Установку для промывки сердца по Лангendorфу [28] промывали 100 мл спирта, затем 200 мл дистиллированной воды со скоростью 10 мл/мин и 50 мл раствора Кребса–Хензеляйта (KHB; в mM 25 HEPES; 118 NaCl; 4.8 KCl; 1.25 MgSO₄; 1.25 K₂HPO₄; pH 7.4) со скоростью 6 мл/мин. Также готовили раствор А (40 мл KHB, 40 мг БСА, 2.4 мг коллагеназы типа 2, 2 мг протеазы, 250 мкM CaCl₂) и инкубировали минимум 30 мин при интенсивном перемешивании.

Крысе внутрибрюшинно вводили гепарин 5000 МЕ/мл (0.1 мл раствора на 100 г массы тела животного), ожидали около 10 мин, затем декапитировали с помощью гильотины. Сердце извлекали в ходе торакотомии и помещали его в стакан с 20 мл раствора KHB для дополнительного очищения от крови после нескольких циклов сокращения.

Запускали установку для перфузии сердца по Лангendorфу, состоящую из перистальтического насоса и нагревателя, сердце переносили в чашку Петри с 15 мл раствора KHB, очищали от жира и фрагментов легких, после чего подвешивали за аорту на канюлю установки, не останавливая ток KHB. Подвязывали все крупные сосуды хлопчатобумажными лигатурами и промывали сердце раствором KHB 17 мин со скоростью 6 мл/мин. Затем начинали ферментативную обработку сердца: промывали сосуды 40 мл раствора А в течение 40 мин, зациклив установку. По окончании перфузии сердце помещали в чашку Петри с 5 мл KHB и переносили в ламинарный бокс для дальнейшей работы в стерильных условиях.

Выделение первичной культуры взрослых желудочковых кардиомиоцитов крыс. Сердце перекладывали в чашку Петри с 5 мл раствора Б (5 мл KHB; 5 мг BDM (2,3-бутандион 2-моноксим)), удаляли предсердия и фрагменты соединительных тканей. Желудочки измельчали с помощью ножниц и ресуспендировали полученные фрагменты пластиковым носиком для пипетки на 1000 мкл с отрезанным кончиком. Затем добавляли 5 мл раствора В (5 мл раствора А, 50 мг БСА, 25 мкл 20 mM CaCl₂) и фильтровали суспензию через сетчатый фильтр с размером ячеек 100 мкм. Затем промывали сеточку и чашку Петри 5 мл раствора В.

Для отделения кардиомиоцитов от кардиофибробластов центрифугировали суспензию клеток в течение 3 мин при 100 °С. Удаляли супернатант с помощью серологической пипетки и ресуспендировали клетки в 25 мл раствора В, после чего аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки и давали клеткам осесть под силой гравитации в течение 7 мин.

Жидкость над осевшими кардиомиоцитами удаляли, а клетки снова ресуспендировали в 25 мл раствора В. Затем раствор титровали последовательными добавками 20 мМ CaCl₂ (250 мкл, 375 мкл, 500 мкл) через каждые 3 мин, после чего центрифугировали полученную суспензию в течение 3 мин при 100 g. Супернатант аккуратно отбирали серологической пипеткой, осевшие клетки ресуспендировали в 6 мл питательной среды ДМЕМ (среда Игла, модифицированная Дульбекко), содержащей 10% эмбриональной телячей сыворотки (ЭТС).

Перед сорбцией кардиомиоцитов из лунок культурального планшета и конфокальных чашек отбирали раствор с фибронектином. Плотность посадки культуры определяли визуально при осмотре лунок планшета в световой микроскоп; при необходимости добавляли еще культуральной среды или суспензии клеток. Затем давали клеткам прикрепиться 2 ч в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Мертвые и неприкрепившиеся клетки удаляли промыванием лунок и чашек 1 мл ДМЕМ с добавлением 10% ЭТС, после чего добавляли 400 мкл среды, выдерживали 2 ч в CO₂-инкубаторе и отбирали кондиционированную среду из лунок планшета для дальнейшего определения в ней концентрации натрийуретического пептида В типа (BNP); образцы замораживали и хранили при -20 °C.

Жизнеспособность изолированных кардиомиоцитов определяли при помощи AlamarBlue. Флуоресценцию кондиционированной среды с реагентом при 590 нм измеряли на мультимодальном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH), после чего усредняли данные и нормировали сигнал, полученный из лунок планшета с клетками, выделенными из крыс группы 1П1К, на сигнал от лунок с клетками, выделенными из сердец контрольной группы крыс – ЛО. Затем полученное отношение нормировали на концентрацию тотального белка в лунке, измеренного методом Бредфорд [29].

Иммунохимические методы

Флуороиммунный анализ “сэндвич-типа” (ФИА). Для специфической детекции натрийуретического пептида В-типа в сыворотке крови крыс и кондиционированной среде взрослых желудочковых кардиомиоцитов использовали трехстадийную иммунохимическую систему “сэндвич”-типа. В качестве нижних (первичных) антител были использованы моноклональные антитела 24c5 или 50E1cc, а в качестве детекторных (вторичных) антител – моноклональные антитела Ab-2 Eu* или 130ccEu*, коньюгированные со стабильным хелатом европия. Все измерения проводили в двух повторностях. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл раствора антител в ФСБ с концентрацией 10 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре на орбитальном шейкере, после чего отмывали промывочным буфером (мМ: 10 Трис-HCl, 150 NaCl, 0.05% NaN₃, 0.05% BSA, 0.025% Tween 20, pH 7.8). На второй стадии в лунки вносили по 150 мкл сыворотки крови, разведенной в 10 раз в Assay buffer (мМ: 50 Трис-HCl, 150 NaCl, 0.5% BSA, 0.05% NaN₃, 0.01% Tween-40, pH 7.5) или 150 мкл неразведенной кондиционированной среды первичной культуры кардиомиоцитов. Затем планшет инкубировали в течение 45 мин в аналогичных условиях, отмывали промывочным буфером и вносили 50 мкл раствора детекторных антител в Assay buffer с концентрацией 4 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере, после этого вновь промывали промывочным буфером. В лунки вносили по 200 мкл детектирующего раствора LANFIA (1.75 M NaSCN, 1 M NaCl, 50 mM глицин-NaOH, 5 mM NaHCO₃, 5% глицерин,

20% пропанол-1, pH 10), инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре при перемешивании и измеряли интенсивность флуоресценции на приборе Victor 1420 Multilabel counter (США) с использованием протокола Europium.

Иммуноцитохимическое окрашивание первичной культуры взрослых кардиомиоцитов крыс. Характеристику полученных культур проводили методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител, специфичных к маркеру кардиомиоцитов – сердечной изоформе тропонина I. Клетки также окрашивали фаллоидином, связывающим фибрillлярный актин, и ядерным интеркалирующим красителем DAPI. Для “негативного” контроля культуры окрашивали вторичными поликлональными антителами без использования первичных антител, специфичных к человеческому сTnI; для “изотип” контроля использовали первичные антитела того же изотипа (IgG1), но специфичные к нейрональному маркеру – глиальному фибрillлярному кислому белку (GFAP). Из конфокальных чашек отбирали культуральную среду и три раза промывали ФСБ (в mM 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 1.76 KH₂PO₄, pH 7.4). Затем к клеткам добавляли ФСБ, содержащий параформальдегид и Triton X-100 в концентрации 4% и 0.1% соответственно, инкубировали 15 мин при комнатной температуре для фиксации клеток на стекле чашки и образования пор в мембранах кардиомиоцитов. После инкубации промывали чашки ФСБ 3 раза, после чего вносили 1% ЭТС в ФСБТ (ФСБ, 0.5% Tween-20, pH 7.4) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре для блокировки неспецифической сорбции антител. Затем в чашки добавляли раствор специфичных к сTnI первичных антител MF4cc (Hytest, Финляндия) на ФСБТ, содержащем 1% ЭТС, и инкубировали в течение ночи при 4 °C. На следующий день чашки 5 раз промывали ФСБТ и вносили раствор (1 : 10000) вторичных поликлональных антител, специфичных к Fc-фрагментам первичных антител мыши, коньюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-555 в буфере идентичного состава. Одновременно добавляли раствор фаллоидина, коньюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488, после чего инкубировали чашки в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации чашки 5 раз промывали ФСБТ, затем добавляли специфический краситель хроматина DAPI, приготовленный на ФСБ в разведении 1 : 1000, и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации трижды промывали лунки ФСБ. Полученные препараты визуализировали с использованием флуоресцентного инвертированного микроскопа Olympus Fv-300 (Япония).

Статистический анализ. Для статистической оценки полученных данных использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8.0. Оценка нормальности распределения выборки была выполнена при помощи теста Шапиро–Уилка. Для данных с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки, либо двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки для множественных сравнений. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение или среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Количество отдельных измерений и уровни значимости указаны в подписях к рисункам. Различия считались значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика физиологического состояния животных после моделирования реноваскулярной гипертензии

На первом этапе работы были проведены хирургические операции для моделирования РВГ и сравнение физиологических параметров (давление, масса тела), а также массы различных отделов сердца у трех исследуемых групп крыс – двух контрольных (ЛО, $n = 20$) и крыс с одной работающей почкой (ИП, $n = 16$), а также опытной

группы с одной почкой и одной клипсой (1П1К, $n = 32$). Смертность животных в группе 1П1К составила 34.4% и 5% и 17.6% в группе ЛО и 1П соответственно. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что к 6-й неделе после операции для крыс группы 1П1К (рис. 2а) наблюдали стойкое повышение артериального давления – в 1.5 раза относительно контрольных групп (1П1К: 194.9 ± 21.3 мм рт. ст., $n = 19$;

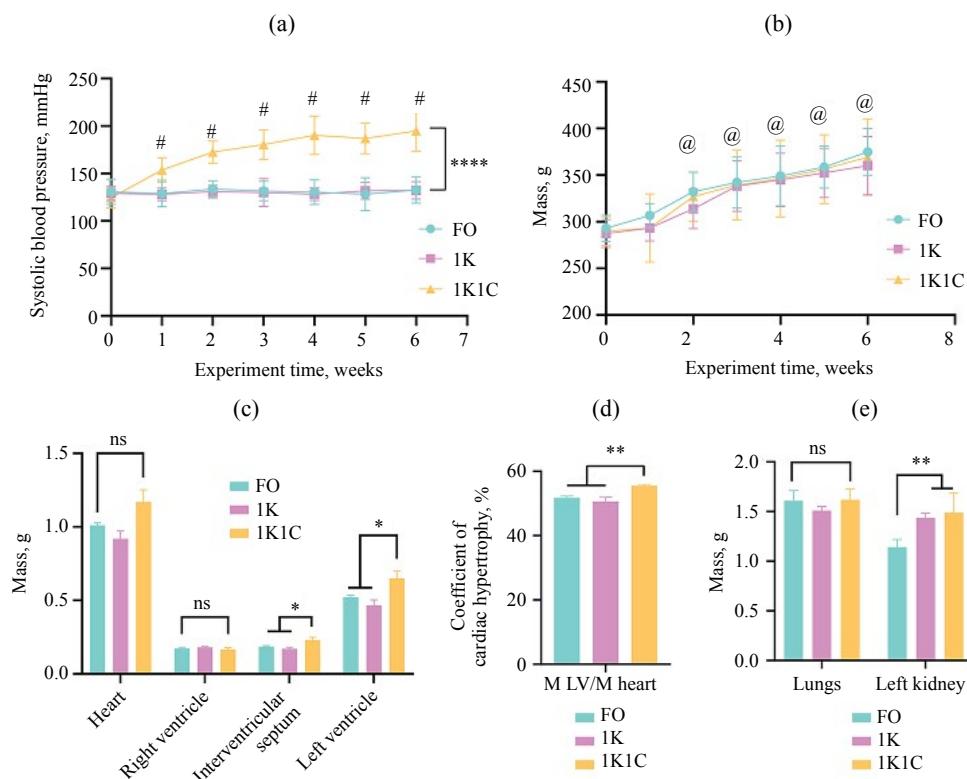


Рис. 2. (а) – Динамика изменения систолического артериального давления у крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 19$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 16$) и FO (ЛО; $n = 19$). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Данные проанализированы при помощи двухфакторного ANOVA. (б) – Динамика изменения массы тела крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 19$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 16$) и FO (ЛО; $n = 19$). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Данные проанализированы при помощи двухфакторного ANOVA. (в) – Масса отделов сердца крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 4$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 3$) и FO (ЛО; $n = 5$). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы при помощи однофакторного ANOVA. (г) – Коэффициенты выраженности гипертрофии левого желудочка крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 5$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 3$) и FO (ЛО; $n = 4$). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Данные проанализированы при помощи однофакторной ANOVA с апостериорной поправкой Шидака. M heart – масса сердца, г; LV – левый желудочек. (д) – Масса легких и левой почки крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 4$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 3$) и FO (ЛО; $n = 5$). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы при помощи однофакторного ANOVA. # – Статистически значимые отличия в группе 1К1С относительно исходного значения артериального давления в этой группе, $p < 0.0001$. @ – Статистически значимые отличия от нулевой точки во всех экспериментальных группах $p < 0.0001$; **** – статистически значимые отличия группы 1К1С от групп 1К и FO; $p < 0.0001$. ** – статистически значимые отличия группы 1К1С от групп 1К и FO; $p < 0.01$. * – статистически значимые отличия группы 1К1С от групп 1К и FO; $p < 0.05$. ns – различия данных незначимы.

1П: 132.2 ± 9.2 мм рт. ст., $n = 16$, ЛО: 132.5 ± 13.8 мм рт. ст., $n = 19$; $p < 0.0001$). Для крыс групп 1П и ЛО повышение артериального давления в течение 6 недель после операции не наблюдали (САД животных в нулевой точке 1П: 129.1 ± 7.4 мм рт. ст., $n = 16$, ЛО: 130.8 ± 13.5 мм рт. ст., $n = 19$; $p < 0.0001$).

Значимых отличий по массе между разными группами выявлено не было (рис. 2б); все крысы набирали массу тела в течение 6 недель после проведения операции (масса тела животных в нулевой точке 1П1К: 289.8 ± 15.5 г, $n = 19$; 1П: 287.3 ± 15 г, $n = 16$, ЛО: 293 ± 14.1 г, $n = 19$; масса тела животных к 6-й неделе после операции 1П1К: 369.2 ± 41 г, $n = 19$; 1П: 360 ± 31.4 г, $n = 16$, ЛО: 374.8 ± 25 г, $n = 19$; $p < 0.0001$).

Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое увеличение массы левого желудочка на 20% (1П1К: 0.65 ± 0.05 г, $n = 5$; 1П: 0.47 ± 0.04 г, $n = 3$, ЛО: 0.52 ± 0.01 г, $n = 4$; $p < 0.05$) и увеличение массы межжелудочковой перегородки на 20% (1П1К: 0.23 ± 0.02 г, $n = 5$; 1П: 0.17 ± 0.01 г, $n = 3$, ЛО: 0.19 ± 0.01 г, $n = 4$; $p < 0.05$) у экспериментальной группы крыс относительно двух контрольных групп при морфометрии отделов сердца (рис. 2с). Значимых отличий в массе правого желудочка между всеми группами крыс не выявлено (1П1К: 0.17 ± 0.01 г, $n = 5$; 1П: 0.18 ± 0.01 г, $n = 3$, ЛО: 0.17 ± 0.01 г, $n = 4$; $p = 0.66$).

Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорной поправкой Шидака показал значимые отличия в коэффициентах гипертрофии левого желудочка (М ЛЖ/М сердца 1П1К: $55.5 \pm 0.4\%$, $n = 5$; 1П: $50.6 \pm 1.3\%$, $n = 3$, ЛО: $51.7 \pm 0.6\%$, $n = 4$; $p < 0.01$) у экспериментальной группы крыс относительно двух контрольных групп (рис. 2д).

Однофакторный дисперсионный анализ не выявил значимых отличий (рис. 2е) между массой легких всех групп модельных животных (1П1К: 1.62 ± 0.11 г, $n = 5$; 1П: 1.51 ± 0.04 г, $n = 3$, ЛО: 1.61 ± 0.1 г, $n = 4$; $p = 0.29$), однако масса левой почки у крыс типа 1П1К и 1П достоверно увеличена относительно ЛО крыс (1П1К: 1.49 ± 0.2 г, $n = 5$; 1П: 1.44 ± 0.05 г, $n = 3$, ЛО: 1.14 ± 0.08 г, $n = 4$; $p < 0.01$).

Таким образом, оценка физиологических и морфологических параметров у крыс контрольных и опытной групп показала, что у групп 1П1К происходит развитие левожелудочковой гипертрофии.

Оценка функций почек после моделирования реноваскулярной гипертензии у взрослых крыс

Далее нами была оценена почечная функция у всех исследуемых групп крыс. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорной поправкой Тьюки выявил повышение клиренса креатинина в группе 1П1К (рис. 3а), достигающее разницы в 1.5 раза по сравнению с группами 1П и ЛО к 6-й неделе после проведения операции (1П1К: 59.6 ± 2.9 мл/сутки, $n = 16$; 1П: 40.4 ± 2.3 мл/сутки, $n = 14$, ЛО: 40.4 ± 1.8 мл/сутки, $n = 15$; $p < 0.0001$). Значимых различий в объеме суточной экскреции между крысами с одной почкой и ЛО крысами выявлено не было. Также нам не удалось выявить значимых отличий в концентрации креатина в плазме крови между контрольными группой и группой 1П1К.

Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорной поправкой Тьюки показал значимое повышение концентрации мочевины в сыворотке крови (рис. 3б) у крыс группы 1П1К в среднем в 1.4 раза относительно контрольных групп (1П1К: 4.7 ± 0.2 ммоль/л, $n = 18$; 1П: 3.6 ± 0.2 ммоль/л, $n = 15$, ЛО: 3.1 ± 0.2 ммоль/л, $n = 17$; $p \leq 0.0001$).

Также было показано повышение концентрации мочевины в моче (рис. 3с) у крыс группы 1П1К в среднем в 1.3 раза относительно групп 1П и ЛО (1П1К: 13 ± 0.7 ммоль/сутки·кг, $n = 16$; 1П: 10.8 ± 0.4 ммоль/сутки · кг, $n = 11$, ЛО: 9.9 ± 0.8 ммоль/сутки·кг, $n = 14$; $p < 0.002$).

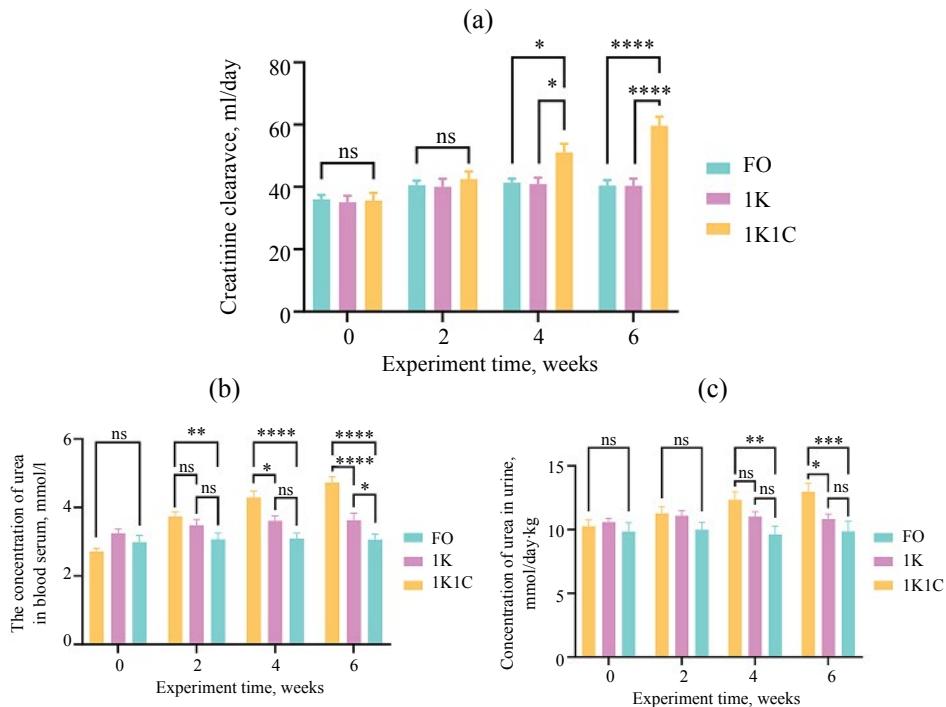


Рис. 3. (а) – Динамика изменения клиренса креатинина у крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 16$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 14$) и FO (ЛО; $n = 15$). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы с помощью двухфакторного ANOVA с апостериорной поправкой Тьюки. (б) – Динамика изменения концентрации мочевины в сыворотке крови у крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 18$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 15$) и FO (ЛО; $n = 17$). (в) – Динамика изменения концентрации мочевины в моче у крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 16$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 11$) и FO (ЛО; $n = 14$). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы с помощью двухфакторного ANOVA с апостериорной поправкой Тьюки. **** – $p < 0.0001$ – статистически значимые различия между экспериментальной группой 1К1С и контрольными группами 1К и FO; *** – $p < 0.001$ – статистически значимые различия между экспериментальной группой 1П1К и контрольной группой ЛО; ** – $p < 0.01$ – статистически значимые различия между экспериментальной группой 1К1С и контрольной группой FO; * – $p < 0.05$ – статистически значимые различия между экспериментальной группой 1П1К и контрольными группами 1К и FO; ns – различия данных незначимы.

Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорной поправкой Тьюки не выявил значимых отличий в концентрации натрия (рис. 4а) в сыворотке крови (1П1К: 126.9 ± 7.4 ммоль/л, $n = 16$; 1П: 174.3 ± 15.3 ммоль/л, $n = 16$, ЛО: 159.6 ± 8.1 ммоль/л, $n = 16$; $p = 0.58$), концентрации натрия (рис. 4б) в моче (1П1К: 6.2 ± 0.4 ммоль/сутки·кг, $n = 17$; 1П: 4.9 ± 0.4 ммоль/сутки·кг, $n = 17$, ЛО: 5.1 ± 0.5 ммоль/сутки·кг, $n = 18$; $p = 0.23$), концентрации калия (рис. 4с) в сыворотке крови (1П1К: 5.6 ± 0.2 ммоль/л, $n = 18$; 1П: 5.1 ± 0.2 ммоль/л, $n = 15$, ЛО: 5.3 ± 0.2 ммоль/л, $n = 18$; $p = 0.53$) и концентрации калия (рис. 4д) в моче (1П1К: 2.4 ± 0.2 ммоль/сутки·кг, $n = 18$; 1П: 2.6 ± 0.2 ммоль/сутки·кг, $n = 16$, ЛО: 2.5 ± 0.2 ммоль/сутки·кг, $n = 18$; $p = 0.91$) между всеми группами животных.

Таким образом, нам удалось продемонстрировать, что у крыс из группы 1П1К увеличена почечная экскреция и возрастает концентрация мочевины в крови и в моче, что свидетельствует об усилении почечной функции, которое могло возникнуть в результате повышенной нагрузки на единственную почку вследствие возникшей артериальной

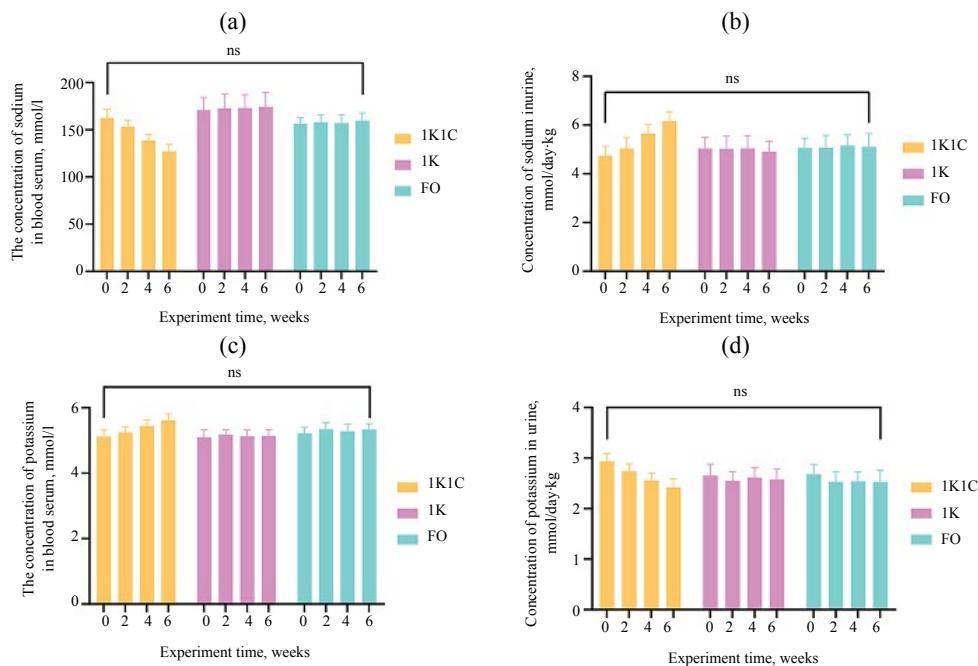


Рис. 4. (а) – Динамика изменения концентрации натрия в сыворотке крови крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 16$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 16$) и FO (ЛО; $n = 16$). (б) – Динамика изменения концентрации натрия в моче крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 17$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 17$) и FO (ЛО; $n = 18$). (в) – Динамика изменения концентрации калия в сыворотке крови крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 18$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 15$) и FO (ЛО; $n = 18$). (г) – Динамика изменения концентрации калия в моче крыс с реноваскулярной гипертензией 1К1С (1П1К; $n = 18$) по сравнению с контрольными группами 1К (1П; $n = 16$) и FO (ЛО; $n = 18$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы с помощью двухфакторный ANOVA с апостериорной поправкой Тьюки; ns – различия между экспериментальной группой 1К1С и контрольными группами 1К и FO незначимы.

гипертензии. Для дальнейшей характеристики развития РВГ мы определили концентрацию BNP – маркера гипертрофии и сердечной недостаточности в крови у всех трех групп исследуемых животных.

Определение концентрации натрийуретического пептида В-типа у крыс в образцах сыворотки крови

Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорной поправкой Тьюки выявил значимые отличия в концентрации BNP в образцах сыворотки крови крыс (рис. 5). Полученные данные показали, что концентрация пептида для группы 1П1К к 6-й неделе после операции увеличивалась в среднем в 2.6 раза относительно исходного уровня (нулевая точка: 2.5 ± 0.3 нг/мл, $n = 12$, шестая неделя 6.4 ± 0.2 нг/мл, $n = 12$, $p < 0.0001$). Кроме того, концентрация BNP у крыс 1П1К к 6-й неделе эксперимента в среднем была в 3 раза выше, чем у ЛО крыс (2.1 ± 0.3 нг/мл, $n = 13$, $p < 0.0001$), и в 2.1 раза выше, чем у крыс группы 1П (3 ± 0.3 нг/мл, $n = 14$, $p < 0.0001$). Значимых отличий между контрольными группами не выявлено ($p = 0.09$).

Таким образом, нам удалось охарактеризовать развитие РВГ и последующей левожелудочковой гипертрофии у крыс с использованием физиологических и биохимических

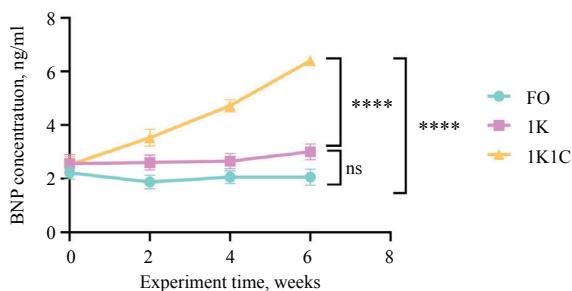


Рис. 5. Динамика концентрации BNP в сыворотке крови крыс с реноваскулярной гипертензией 1K1C (1П1К; $n = 12$) по сравнению с группой 1K (1П; $n = 14$) и контрольной группой FO (ЛО; $n = 13$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы с помощью двухфакторного ANOVA с апостериорной поправкой Тьюки. *** - $p < 0.0001$ – статистически значимые различия между экспериментальной группой 1K1C и контрольными группами 1K и FO к 6-й неделе после индукции гипертрофии; ns – различия данных незначимы.

методов. На данном этапе созданная модель подходит для оценки изменений физиологических параметров, но исследовать молекулярные механизмы на такой модели не представляется возможным. Чтобы установить взаимосвязь между исследованиями с использованием данной модели *in vivo* и *in vitro*, мы предложили следующий подход – получить из гипертрофированных сердец опытных крыс кардиомиоциты и проанализировать их способность сохранять гипертрофированный фенотип после выделения, оценивая секрецию ими BNP. В связи с этим далее мы выделяли кардиомиоциты из контрольных крыс и животных с РВГ, определяли чистоту культуры методом иммуноцитохимического окрашивания и концентрацию BNP в культуральной среде.

Характеристика первичной культуры взрослых желудочковых кардиомиоцитов крыс методом иммуноцитохимического окрашивания

Иммунохимическое окрашивание клеточных культур антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина I, ядерным интеркалирующим красителем DAPI и фаллоидином показало, что полученные культуры полностью представлены кардиомиоцитами (рис. 6).

Отсутствие сигнала при типе окрашивания культур “негативный” контроль с использованием вторичных поликлональных антител, без использования первичных антител, специфичных к человеческому cTnI, исключает неспецифичное связывание используемых поликлональных антител с чем-либо в клетках.

Отсутствие сигнала при типе окрашивания культур “изотип”-контроль, где вместо первичных антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина I, использовали антитела того же изотипа (IgG1), но специфичные к нейрональному маркеру – глиальному фибрillярному кислому белку (GFAP), подтверждает специфичность связывания используемых вторичных антител с первичными антителами.

Определение концентрации натрийуретического пептида В-типа в кондиционированной среде взрослых желудочковых кардиомиоцитов крыс

Анализ жизнеспособности кардиомиоцитов, оцененной по методу Alamar blue, (рис. 7) при помощи непарного *t*-теста показал, что различия между клетками, выделенными из крыс группы 1П1К ($0.89 \pm 0.11 \text{ CPS}_{\text{II}}/\text{CP}_0/\text{мг белка}$) и ЛО ($1 \text{ CPS}_{\text{II}}/\text{CP}_0/\text{мг белка}$), незначимы.

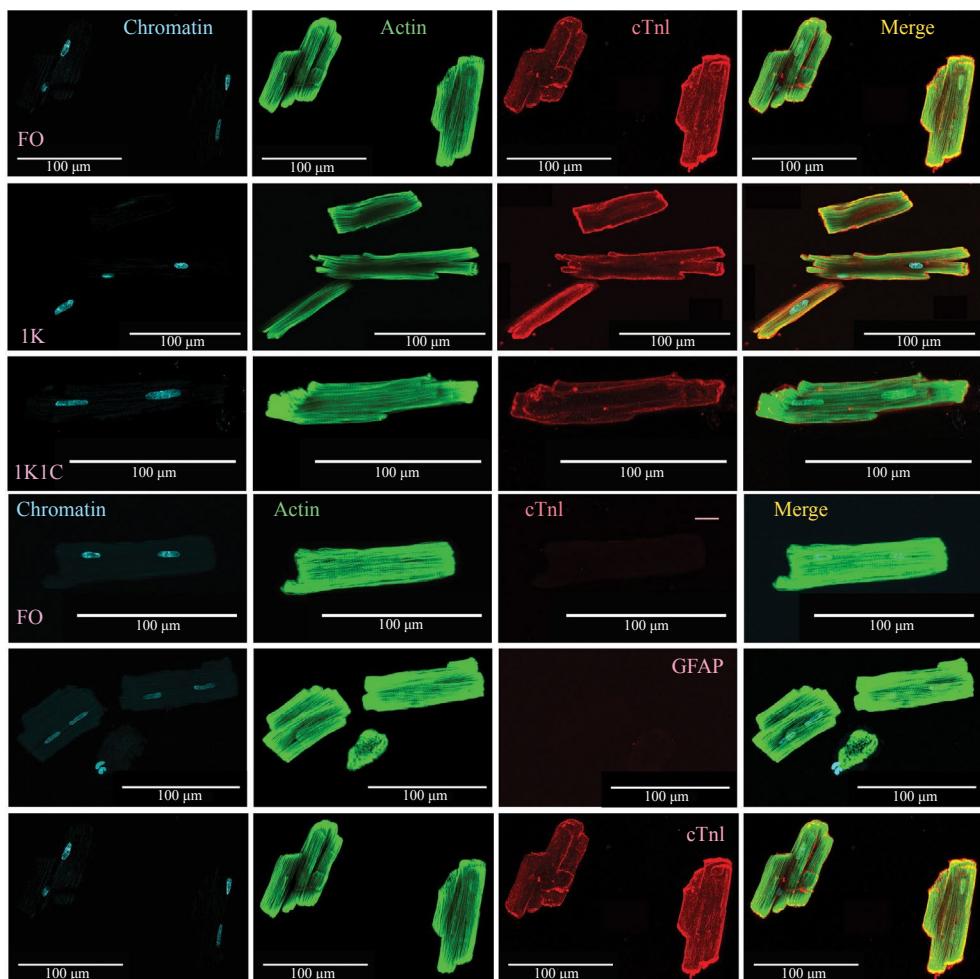


Рис. 6. Результаты иммунохимического окрашивания культур, полученных из сердец всех анализируемых групп: 1К1С – группа крыс с удаленной правой почкой и клипсой, ограничивающей артериальный кровоток левой почки; 1К – группа крыс с удаленной правой почкой и интактной левой почкой; FO – культуры, выделенные из ложнооперированных крыс с двумя интактными почками. Chromatin – окрашивание ядерным интеркарирующим красителем DAPI; Actin – окрашивание фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентной меткой Alexa-488; cTnI – окрашивание антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина I; “–” – окрашивание вторичными поликлональными антителами в отсутствие первичных антител, специфичных к cTnI; GFAP – окрашивание антителами, специфичными к глиальному фибрillлярному кислому белку; Merge – наложение фотографий, сделанных в трех флуоресцентных каналах при одинаковом увеличении.

Из дисперсионного однофакторного анализа результатов флуориммунного анализа “сэндвич”-типа следует, что концентрация пептида в культуре клеток (рис. 8), выделенных из крыс группы 1П1К, в среднем в 4.7 раза выше, чем в двух других группах (0.87 ± 0.15 нг/мл, $n = 9$, $p < 0.001$). В то же время концентрация BNP между группами 1П (0.18 ± 0.03 нг/мл, $n = 6$) и ЛО (0.19 ± 0.02 нг/мл, $n = 9$, $p = 0.99$) практически не различалась.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что кардиомиоциты, полученные из сердец животных с проведенной операцией по

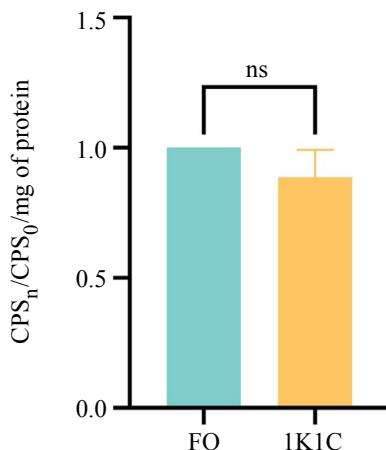


Рис. 7. Оценка жизнеспособности первичных культур желудочковых кардиомиоцитов крыс с реноваскулярной гипертензией 1K1C (1П1К; $n = 2$) по сравнению с контрольной группой крыс FO (ЛО; $n = 2$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего в относительных единицах $\text{CPS}_n/\text{CPS}_0/\text{мг белка}$, где CPS_n – значение флуоресценции в культуре желудочковых кардиомиоцитов 1K1C крыс, CPS_0 – значение флуоресценции в культуре желудочковых кардиомиоцитов FO крыс, mg of protein – мг тотального белка в лунке. Данные проанализированы с помощью t -теста; ns – различия данных незначимы.

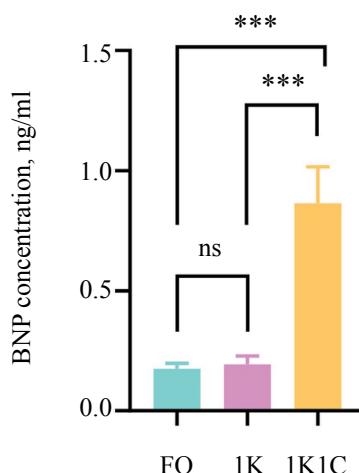


Рис. 8. Концентрация BNP в кондиционированной среде первичных культур желудочковых кардиомиоцитов крыс с реноваскулярной гипертензией 1K1C (1П1К; $n = 9$) по сравнению с контрольными группами 1K (1П; $n = 6$) и FO (ЛО; $n = 9$). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Данные проанализированы с помощью однофакторного ANOVA с апостериорной поправкой Тьюки. *** – $p < 0.001$ – статистически значимые различия между экспериментальной группой 1K1C и контрольными группами 1K и FO; ns – различия данных незначимы.

моделированию РВГ, сохраняют гипертрофический фенотип. Можно заключить, что данная модель может быть использована для разностороннего исследования патологической левожелудочковой гипертрофии как на физиологическом, так и на молекулярном уровнях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже упоминалось ранее, все существующие на сегодняшний день подходы, используемые для исследования гипертрофических изменений в миокарде, можно подразделить на *in vitro* и *in vivo* [26, 30]. Большинство данных о механизмах, лежащих в основе развития гипертрофии в рамках одного исследования, получены, как правило, с использованием одного из вышеупомянутых подходов. Существует ряд работ, в которых авторы для изучения гипертрофии использовали комбинацию технологий *in vitro* и *in vivo*, однако в данном случае эксперименты проводились независимо, например, моделирование гипертрофии *in vivo* и физиологические параметры изучались на одной группе животных, а молекулярные механизмы – на независимой клеточной линии кардиомиоцитов [31, 32]. Однако при анализе литературных источников нам не удалось найти исследований, где технологии *in vitro* и *in vivo* были бы интегрированы для исследования гипертрофии, индуцированной в единственной группе экспериментальных животных. В этой связи разработка подобных моделей может быть актуальным научным направлением, так как позволит разносторонне охарактеризовать не только гипертрофические изменения, но и другие патологические состояния, такие как фиброз или хроническое воспаление.

В качестве *in vivo* технологии развития гипертрофии в нашей работе была использована реноваскулярная модель левожелудочковой гипертрофии. На сегодняшний день разработано несколько *in vivo* технологий моделирования левожелудочковой гипертрофии, каждая из которых направлена на создание условий повышенной нагрузки на желудочки. Левожелудочковая гипертрофия может быть вызвана перегрузкой давлением или объемом. Распространенные модели перегрузки давлением включают пережатие аорты или легочной артерии, или создание аортального клапана, или стеноза клапана легочной артерии [33–36]. Перегрузка по объему может быть достигнута при любом артериовенозном шунтировании бедренных, яремных и/или брюшных сосудов или при возникновении клапанной недостаточности. В данной работе нами была выбрана модель левожелудочковой гипертрофии, возникающей вследствие развития РВГ, поскольку по сравнению с остальными моделями для нее характерна высокая эффективность развития гипертрофии и относительно низкая смертность оперируемых животных [37]. В исследование нами было взято 68 крыс, которые были разделены на три группы – две контрольные (ЛО и 1П) и одну опытную (1П1К). Как и ожидалось, смертность исследуемых животных в результате проведения хирургических операций оказалась выше заявленной в литературе и составила 37% для группы 1П1К и 17.6% и 5% для групп 1П и ЛО соответственно [38]. Стойкое повышение артериального давления при практически не меняющейся массе тела крыс из экспериментальной группы по сравнению с двумя контрольными группами, а также значительное (на 20%) увеличение массы левого желудочка относительно массы других отделов сердца и индекса гипертрофии левого желудочка (в 1.5 раза) свидетельствует об успешном моделировании гипертрофии при использовании данного подхода. Стоит отметить, что крысы с такой формой гипертрофии были активны, подвижны и хорошо себя чувствовали. Это позволяет сделать предположение о том, что нам удалось смоделировать начальные этапы ее развития.

Известно, что при РВГ почечная функция может быть нарушена в разной степени в зависимости от тяжести стеноза почечных артерий и продолжительности заболевания [39]. В некоторых случаях почечная функция может быть нарушена лишь незначительно, тогда как в тяжелых случаях может развиться почечная недостаточность [40]. Таким образом, мы могли ожидать ухудшение функционирования почек у прооперированных крыс в опытной группе по сравнению с контрольными группами. Измерение различных метаболитов в крови контрольных и экспериментальных крыс показало, что в моче и в крови опытной группы наблюдалось значительное (в 1.4–1.5 раза) повышение концентрации мочевины. Кроме этого, мы оценили почечную экскрецию по клиренсу

креатинина и выявили, что у гипертрофированных крыс она усиlena. Полученные нами данные свидетельствуют о нарушении функционирования почечной системы у крыс с РВГ. Также известно, что ухудшения функции почек сопровождаются нарушением электролитного состава в крови и моче, в частности, манифестиацией как гиперкалиемии, так и гипокалиемии [41], а также понижением концентрацией натрия в крови [42]. Тем не менее в нашем случае не удалось выявить значимых отличий в концентрациях натрия и калия в крови и моче у опытной группы крыс по сравнению с контрольными, что не согласуется с данными литературы. Отсутствие электролитных нарушений у РВГ крыс при возрастании концентрации мочевины в крови также свидетельствует о том, что у крыс из опытной группы развившаяся левожелудочковая гипертрофия носит умеренный характер. Для дополнительного анализа левожелудочковой гипертрофии у РВГ-крыс нами была определена концентрация BNP – маркера гипертрофии и сердечной недостаточности – в крови опытных крыс, которая в 3.4 раза превышала таковую у контрольных животных. Для детекции BNP в крови была использована пара антител, специфичная к BNP человека [43–45], чья способность распознавать BNP крысы была протестирована нами в отдельных экспериментах (данные не представлены). Таким образом, с использованием различных подходов нами был проведен разносторонний анализ физиологического и биохимического профиля левожелудочковой гипертрофии у РВГ-крыс и было подтверждено развитие умеренной левожелудочковой гипертрофии у этих животных.

Дальнейшая логика нашего исследования состояла в получении культуры кардиомиоцитов из сердец контрольных и крыс с РВГ и исследовании ее потенциального гипертрофического фенотипа. Иммунохимическое окрашивание антителами, специфичными к белковому маркеру кардиомиоцитов тропонину Т, выявило, что полученные культуры имели морфологию клеток, полученных с использованием технологии по Лангendorфу [23], и на 100% были представлены кардиомиоцитами. Существенной проблемой в работе с данными культурами является их низкая жизнеспособность, поэтому работу с культурами инициировали сразу же, как только клетки прикреплялись к субстрату и приобретали соответствующую морфологию. Жизнеспособность культур, полученных из животных с РВГ, на момент определения концентрации BNP в их кондиционированной среде, также была оценена с использованием резазуринового синего (Alamar blue) и не отличалась от таковой у контрольных клеток. Концентрация BNP в кондиционированной среде культур, полученных из гипертрофированных сердец, в 3 раза превышала таковую в случае контрольных животных, это говорит о том, что кардиомиоциты полученных из сердец животных с индуцированной РВГ *in vivo* сохраняют гипертрофический фенотип и могут быть использованы для дальнейших исследования процессов, протекающих на молекулярном уровне.

Таким образом, предложенная в настоящем исследовании комбинированная методика *in vivo* и *in vitro* технологий позволяет одновременно исследовать как модуляцию физиологических параметров при левожелудочковой гипертрофии на целом животном, так и различные вне- и внутриклеточные процессы, протекающие в гипертрофированных кардиомиоцитах, выделенных из сердца данного животного. Это существенно расширяет спектр исследований в области гипертрофических изменений, с одной стороны, и сокращает их время – с другой, что, несомненно, будет полезно коллегам, занимающимся исследованиями ССЗ. Например, данный подход можно использовать для тестирования различных антигипертрофических и противогипертензивных препаратов и исследования механизмов терапевтического действия лекарств или для изучения молекулярных механизмов, опосредующих различные ССЗ, которые сопровождает гипертрофия (постинфарктное состояние, тахиаритмии, сердечная недостаточность). Идея и результаты данной работы также могут быть транслированы для разработки и усовершенствования моделей альтернативных патологических состояний, сопровождающих различные ССЗ, таких как хроническое воспаление, фибротические изменения в миокарде и др.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д. В. С. и М. М. А.), сбор данных (М. М. А., А. В. М., Д. А. А., В. Е. Ш.), обработка данных (М. М. А., А. В. М.), написание и редактирование манускрипта (Д. В. С., А. В. М., Н. А. М.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Московского государственного университета им. М.М. Ломоносова (протокол № 155-д-з от 19.10.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сердечно-сосудистые заболевания. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Режим доступа: https://www.who.int/ru/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 (дата обращения: 2.06.2025).
2. Cardiac Atrial & Ventricular Hypertrophy, Dilatation & Enlargement (ECG). Режим доступа: <https://ecgwaves.com/topic/cardiac-atrial-ventricular-hypertrophy-dilatation-enlargement-ecg/> (date od access: 2.06.2025).
3. Cramariuc D, Gerdts E (2016) Epidemiology of left ventricular hypertrophy in hypertension: implications for the clinic. Expert Rev Cardiovasc Therapy 14: 915–926.
<https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1186542>
4. Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, Zeriouh M, Schmack B, Farag M, Popov A-F, Dohmen PM, Choi Y-H, Wahlers T, Weymann A (2016) Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. Med Sci Monit Basic Res 22: 75–79.
<https://doi.org/10.12659/MSMBR.900437>
5. Chung E, Leinwand LA (2014) Pregnancy as a cardiac stress model. Cardiovasc Res 101: 561–570.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvu013>
6. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D (2012) Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: Cellular and molecular mechanisms. Heart 98: 5–10.
<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2011-300639>
7. Kavey R-EW (2013) Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Children and Adolescents: Predictors and Prevalence. Curr Hypertens Rep 15: 453–457.
<https://doi.org/10.1007/s11906-013-0370-3>
8. Taegtmeyer H, Sen S, Vela D (2010) Return to the fetal gene program: A suggested metabolic link to gene expression in the heart. Ann New York Acad Sci 1188: 191–198.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x>
9. Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE (2006) Cardiac hypertrophy: Molecular and cellular events. Rev Esp Cardiol 59: 473–486.
10. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA (2004) Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? Circulation 109: 1580–1589.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB>

11. Adasheva DA, Serebryanaya DV (2024) IGF Signaling in the Heart in Health and Disease. *Biochemistry (Moscow)* 89: 1402–1428.
<https://doi.org/10.1134/S0006297924080042>
12. Yang F, Dong A, Mueller P, Caicedo J, Sutton AM, Odetunde J, Barrick CJ, Klyachkin YM, Abdel-Latif A, Smyth SS (2012) Coronary Artery Remodeling in a Model of Left Ventricular Pressure Overload Is Influenced by Platelets and Inflammatory Cells. *PLoS One* 7: e40196.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040196>
13. Kwon S (2003) H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 35: 615–621.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(03\)00084-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(03)00084-1)
14. Tanaka K, Honda M, Takabatake T (2001) Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am College Cardiol* 37: 676–685.
[https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)01123-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)01123-2)
15. Kastner N, Zlabinger K, Spannbauer A, Traxler D, Mester-Tonczar J, Hašimbegović E, Gyöngyösi M (2020) New Insights and Current Approaches in Cardiac Hypertrophy Cell Culture, Tissue Engineering Models, and Novel Pathways Involving Non-Coding RNA. *Front Pharmacol* 11: 1314.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01314>
16. Serebryanaya DV, Adasheva DA, Konev AA, Artemieva MM, Katrukha IA, Postnikov AB, Medvedeva NA, Katrukha AG (2021) IGFBP-4 Proteolysis by PAPP-A in a Primary Culture of Rat Neonatal Cardiomyocytes under Normal and Hypertrophic Conditions. *Biochemistry (Moscow)* 86: 1395–1406.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921110043>
17. Liu Y, Wang Z, Xiao W (2016) MicroRNA-26a protects against cardiac hypertrophy via inhibiting GATA4 in rat model and cultured cardiomyocytes. *Mol Med Rep* 14: 2860–2866.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5574>
18. Leenen FHH, White R, Yuan B (2001) Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system. *Am J Physiol – Heart Circul Physiol* 281: H2410–H2416.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.6.H2410>
19. Wang R, Xi L, Kukreja RC (2017) PDE5 Inhibitor Tadalafil and Hydroxychloroquine Cotreatment Provides Synergistic Protection against Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 361: 29–38.
<https://doi.org/10.1124/jpet.116.239087>
20. Hu C-M, Chen Y-H, Chiang M-T, Chau L-Y (2004) Heme Oxygenase-1 Inhibits Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy In Vitro and In Vivo. *Circulation* 110: 309–316.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135475.35758.23>
21. Berry JM, Naseem RH, Rothermel BA, Hill JA (2007) Models of cardiac hypertrophy and transition to heart failure. *Drug Discov Today: Disease Models* 4: 197–206.
<https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2007.06.003>
22. Doggrell S (1998) Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 39: 89–105.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00076-5)
23. Textor SC, Lerman L (2010) Renovascular Hypertension and Ischemic Nephropathy. *Am J Hypertens* 23: 1159–1169.
<https://doi.org/10.1038/ajh.2010.174>
24. Souza HCD, Martins-Pinge MC, Dias Da Silva VJ, Borghi-Silva A, Gastaldi AC, Blanco JHD, Tezini GCSV (2008) Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. *Auton Neurosci* 139: 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2008.01.001>
25. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934) STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *J Exp Med* 59: 347–379.
<https://doi.org/10.1084/jem.59.3.347>
26. Lu B, Yu H, Zwartbol M, Ruifrok WP, Van Gilst WH, De Boer RA, Silljé HHW (2012) Identification of hypertrophy- and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models. *Physiol Genom* 44: 443–454.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00148.2011>

27. Илатовская МЕ, Позднев ВФ, Андреев-Андреевский АА, Медведева НА (2012) Блокада синтеза эндотелина-1 усиливает степень развития реноваскулярной гипертензии в экспериментах на крысах. Рес физиол журн им ИМ Сеченова 98(7): 836–844. [Ilatovskaya ME, Pozdnyov VF, Andreev-Andrievsky AA, Medvedeva NA (2012) Blockade of endothelin-1 synthesis enhances the development of renovascular hypertension in rat experiments. Russ J Physiol 98(7): 836–844. (In Russ)].
28. Langendorff O (1898) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen: III. Abhandlung. Vorübergehende Unregelmässigkeiten des Herzschlages und ihre Ausgleichung. Pflüger Arch 70: 473–486.
<https://doi.org/10.1007/BF01662056>
29. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt Biochem 72: 248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
30. Prajapati AK, Shah G (2024) Exploring *in vivo* and *in vitro* models for heart failure with biomarker insights: a review. Egypt Heart J 76: 141.
<https://doi.org/10.1186/s43044-024-00568-1>
31. Jamhiri M, Safi Dahej F, Astani A, Hejazian SH, Hafizibarjin Z, Ghobadi M, Moradi A, Khoradmehr A, Safari F (2019) Carvacrol Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy in Both In-vivo and In-vitro Models. Int J Pharm Res 18.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100766>
32. Qi H, Ren J, E M, Zhang Q, Cao Y, Ba L, Song C, Shi P, Fu B, Sun H (2019) MiR-103 inhibiting cardiac hypertrophy through inactivation of myocardial cell autophagy via targeting TRPV 3 channel in rat hearts. J Cell Mol Med 23: 1926–1939.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14095>
33. Burrington JD (1978) Tracheal growth and healing. J Thorac Cardiovasc Surg 76: 453–458.
34. Copeland JC, Reitz BA, Roberts AJ, Michaelis LL (1974) Hypothermic Asanguineous Circulatory Arrest in Adult Dogs: Ann Surgery 180: 728–733.
<https://doi.org/10.1097/00000658-197411000-00004>
35. Rodger IW (1971) Actions of the sympathomimetic bronchodilator, AQL208, on the cardiovascular, bronchiolar and skeletal muscle systems of the cat. J Pharm Pharmacol 23: 226S.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1971.tb08808.x>
36. Walther T, Wessel N, Kang N, Sander A, Tschöpe C, Malberg H, Bader M, Voss A (2000) Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. Braz J Med Biol Res 33: 1–9.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000100001>
37. Wan J, Wang P, Liu S, Wang X, Zhou P, Yang J (2024) Risk factors and a predictive model for left ventricular hypertrophy in young adults with salt-sensitive hypertension. J Clin Hyperten 26: 933–944.
<https://doi.org/10.1111/jch.14863>
38. Ding Y, Wang Y, Jia Q, Wang X, Lu Y, Zhang A, Lv S, Zhang J (2020) Morphological and Functional Characteristics of Animal Models of Myocardial Fibrosis Induced by Pressure Overload. Int J Hyperten 2020: 1–14.
<https://doi.org/10.1155/2020/3014693>
39. Hayashi K, Suzuki T, Sakamaki Y, Ito S (2018) Cardiac hypertrophy in chronic kidney disease—role of Aldosterone and FGF23. Ren Replace Ther 4: 10.
<https://doi.org/10.1186/s41100-018-0152-0>
40. Taddei S, Nami R, Bruno RM, Quatrini I, Nuti R (2011) Hypertension, left ventricular hypertrophy and chronic kidney disease. Heart Fail Rev 16: 615–620.
<https://doi.org/10.1007/s10741-010-9197-z>
41. Chaihongsa N, Maneesai P, Sangartit W, Rattanakanokchai S, Potue P, Khamseechaew J, Bunbupha S, Pakdeechote P (2022) Cardiorenal dysfunction and hypertrophy induced by renal artery occlusion are normalized by galangin treatment in rats. Biomed Pharmacother 152: 113231.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113231>
42. Oluboyo A, Omon E, Oluboyo B, Odewusi O, Edet O (2025) Correlation of renal biomarkers, electrolyte imbalances and vitamin D levels in hypertensive subjects. Med Int 5: 20.
<https://doi.org/10.3892/mi.2025.219>

43. Tamm NN, Seferian KR, Semenov AG, Mukharyamova KS, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Postnikov AB, Serebryanaya DV, Apple FS, Murakami MM, Katrukha AG (2008) Novel Immunoassay for Quantification of Brain Natriuretic Peptide and Its Precursor in Human Blood. *Clin Chem* 54: 1511–1518.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.100545>
44. Tamm NN, Semenov AG, Seferian KR, Bereznikova AV, Murakami MM, Apple FS, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Katrukha AG (2011) Measurement of B-type natriuretic peptide by two assays utilizing antibodies with different epitope specificity. *Clin Biochem* 44: 257–259.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.09.030>
45. Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, Mukharyamova KS, Tolstaya AA, Koshkina EV, Kara AN, Krasnoselsky MI, Apple FS, Esakova TV, Filatov VL, Katrukha AG (2007) The Brain Natriuretic Peptide (BNP) Precursor Is the Major Immunoreactive Form of BNP in Patients with Heart Failure. *Clin Chem* 53: 866–873.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.076141>

A Combination of *in vitro* and *in vivo* Approaches to Studying the Mechanisms of Myocardial Hypertrophy Development in Adult Rats with Renovascular Hypertension

A. V. Makeeva^a, M. M. Artemieva^a, D. A. Adasheva^a, V. E. Shein^a, N. A. Medvedeva^a, and D. V. Serebryanaya^{a, b, *}

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Pirogov Russian National Research Medical University, Institute of Neuroscience and Neurotechnology, Moscow, Russia*

**e-mail: dariaserebryanaya@gmail.com*

Hypertrophic changes in the ventricular myocardium accompany most cardiovascular diseases and represent a serious risk factor for sudden cardiac death. To date, a wide range of *in vitro* and *in vivo* models of hypertrophy have been developed; however, none of them allow for the simultaneous investigation of both biochemical and physiological aspects of its pathogenesis. This study proposes a method based on the induction of left ventricular hypertrophy (LVH) resulting from renovascular hypertension in rats, followed by the isolation of cardiomyocytes from their hearts. The study included 68 animals (32 1K1C type rats, 16 1K type rats, and 20 sham-operated (SO) rats). To induce LVH in the “one kidney one clip” (1K1C) rats, a clip was placed on the renal artery of the left kidney to restrict blood flow, after which the right kidney was removed. In the “one kidney” (1K) group, the right kidney was removed while the left kidney was remained intact, whereas in SO rats, the abdominal cavity was opened and then sutured without any manipulation of the kidneys. The latter two groups served as controls. After 1.5 months, the left ventricular mass in 1K1C rats exceeded that in both control groups by 1.2 times, while the arterial pressure in the 1K1C group increased by 1.4 times compared to both controls. Additionally, 1K1C rats exhibited a 1.4-fold increase in serum and urinary urea concentrations and a 1.5-fold enhancement in renal excretion, as assessed by creatinine clearance, compared to the control groups. The serum concentration of B-type natriuretic peptide (BNP) in 1K1C rats was twice as high as in the control groups. After LVH induction, primary cardiomyocyte cultures were derived from the hearts of control and hypertrophic rats. In the conditioned medium of the primary culture of ventricular cardiomyocytes from 1K1C rats, the BNP concentration was 3.4 times higher than in the control groups. Thus, it was demonstrated that cardiomyocytes isolated from 1K1C rats retain a hypertrophic phenotype, and this combined approach can be used to study cardiac hypertrophy *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: cardiovascular diseases, hypertrophy, myocardium, renovascular hypertension, renal artery, cardiomyocytes, type B natriuretic peptide