

Влияние ингаляций водорода на сердечно-сосудистые и интерстициальные компоненты легочной гипертензии в экспериментах на крысах

Т.А.Куропаткина^{1,2}, Х.Ф.Гуфранов¹, Ф.Ю.Сычев¹, М.М.Артемяева¹, Г.Н.Бондаренко¹, Д.И.Есауленко³, Т.В.Самойленко³, В.В.Шишкина³, Н.А.Медведева¹, О.С.Медведев^{1,4} ✉

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации: 119992, Россия, Москва, Ленинские горы, 1

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 127051, Россия, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н.Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 394036, Россия, Воронеж, ул. Студенческая, 10

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И.Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 121552, Россия, Москва, ул. Академика Чазова, 15А

Резюме

Известно, что водород проявляет избирательные антиоксидантные свойства, связывая высокореактивные гидроксильные радикалы. Патогенез монокроталиновой (МКТ) модели легочной гипертензии (ЛГ) на животных связан с окислительным стрессом и проявляет все симптомы ЛГ и интерстициальной болезни легких (ИБЛ), ассоциированной с гипертензией. **Целью** исследования явилось изучение влияния ингаляций 4%-го водорода на симптомы ЛГ и ИБЛ в экспериментах на крысах. **Материалы и методы.** Для моделирования МКТ-индуцированной ЛГ (МКТ-ЛГ) в 1-й день эксперимента животным 2 групп однократно подкожно вводился МКТ, крысам контрольной группы — только растворитель для МКТ. Затем животные, получавшие МКТ, были распределены на 2 подгруппы: крысы 1-й подгруппы дышали комнатным воздухом, 2-й подгруппы — смесью комнатного воздуха и 4%-го водорода. Ингаляции были постоянными в течение 21 дня. На 21-й день под уретановым наркозом измерялись гемодинамические параметры, после эвтаназии у животных взвешивались сердце и его составляющие, легкие; ткань легкого сохранялась для морфологического исследования. **Результаты.** Влияния ингаляций на основные сердечно-сосудистые симптомы ЛГ не выявлено, однако показано положительное влияние на состояние соединительной ткани легких, страдающей при ЛГ. Реакция тучных клеток (ТК) уменьшена как количественно, так и функционально. Наблюдалось снижение экспрессии триптазы ТК с преобладанием форм без признаков дегрануляции. Секретция TGF- β была также значительно уменьшена и визуализировалась иммунопозитивными клетками в альвеолярных ячеистых структурах и стенках сосудов. **Заключение.** Ингаляции 4%-го водорода способствуют снижению воспаления и фиброзированию легочной ткани при развитии МКТ-ЛГ.

Ключевые слова: молекулярный водород, ингаляции, монокроталиновая форма легочной гипертензии, интерстициальная болезнь легких, тучные клетки, триптаза, фиброз, TGF- β , крысы.

Конфликт интересов. Конфликт интересов авторами не заявлен.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания Правительства Российской Федерации Федеральному государственному бюджетному образовательному учреждению высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации № 121032300071-8.

Этическая экспертиза. Исследование проводилось в соответствии с принципами Директивы Европейского совета 86/609/ЕЕС, протокол одобрен комиссией по биоэтике Института биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации (протокол № 113-Г от 19.06.20).

© Куропаткина Т.А. и соавт., 2024

Для цитирования: Куропаткина Т.А., Гуфранов Х.Ф., Сычев Ф.Ю., Артемяева М.М., Бондаренко Г.Н., Есауленко Д.И., Самойленко Т.В., Шишкина В.В., Медведева Н.А., Медведев О.С. Влияние ингаляций водорода на сердечно-сосудистые и интерстициальные компоненты легочной гипертензии в экспериментах на крысах. *Пульмонология*. 2024; 34 (1): 19–30. DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-1-19-30

Effect of hydrogen inhalation on cardiovascular and interstitial components of pulmonary hypertension in rats

Tatyana A. Kuropatkina^{1,2}, Khaydar F. Gufranov¹, Fyodor Yu. Sychev¹, Marina M. Artemieva¹, Grigori N. Bondarenko¹, Dmitriy I. Esaulenko³, Tatyana V. Samoylenko³, Viktoriya V. Shyshkina³, Natalia A. Medvedeva¹, Oleg S. Medvedev^{1,4} ✉

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation: Leninskiye gory 1, build. 40, Moscow, 119992, Russia

² Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expertise of Medical Products” of the Ministry of Health of Russia: Petrovskiy bul’var 8, build. 2, Moscow, 127051, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “N.N.Burdenko Voronezh State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation: Studencheskaya 10, Voronezh, 394622, Russia

⁴ Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Centre of Cardiology named after Academician E.I.Chazov” of the Ministry of Health of the Russian Federation: ul. Akademika Chazova 15A, Moscow, 121552, Russia

Abstract

Hydrogen is known to have selective antioxidant properties. It binds highly reactive hydroxyl radicals. The pathogenesis of the monocrotaline animal model of pulmonary hypertension is associated with oxidative stress and leads to all the symptoms of pulmonary hypertension (PH) and interstitial lung disease (ILD) associated with hypertension. **The aim** of this work was to study the effect of 4% hydrogen inhalations on the symptoms of PH and ILD in rats. **Methods.** To model monocrotaline-induced pulmonary hypertension (MCT-PH), two groups of animals received a single subcutaneous injection of monocrotaline (MCT) on day 1. The control group was injected subcutaneously with MCT solvent only. The animals receiving MCT were further divided into 2 subgroups. Subgroup 1 rats breathed room air and subgroup 2 rats breathed a mixture of room air and 4% hydrogen. The regular inhalations continued until day 21. On day 21, hemodynamic parameters were measured under urethane anesthesia, the heart and its components and the lungs were weighed, and lung tissue was preserved for morphological study. **Results.** The inhalation had no effect on the main cardiovascular symptoms of PH, but a positive effect on the state of the connective tissue of the lungs affected by PH was shown. The mast cell response was reduced both quantitatively and functionally. There was a decrease in tryptase expression by mast cells, with predominance of the forms without signs of degranulation. TGF- β secretion was also significantly reduced and visualized by immunopositive cells in alveolar cellular structures and vessel walls. **Conclusion.** Inhalation of 4% hydrogen reduces inflammation and fibrosis of lung tissue during the development of MCT-PH.

Key words: molecular hydrogen, inhalation, monocrotaline form of pulmonary hypertension, interstitial lung disease, mast cells, tryptase, fibrosis, TGF- β , rats.

Conflict of interest. No conflict of interest has been declared by the authors.

Funding. The study was carried out within the framework of a scientific project of the state assignment of the Government of the Russian Federation to the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation No.121032300071-8.

Ethical review. The study was conducted in accordance with the principles of European Council Directive 86/609/EEC, and the protocol was approved by the Bioethics Commission of the Institute of Biology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation (protocol 113-G, dated June 19, 2020).

© Kuropatkina T.A. et al., 2024

For citation: Kuropatkina T.A., Gufranov Kh.F., Sychev F.Yu., Artemieva M.M., Bondarenko G.N., Esaulenko D.I., Samoylenko T.V., Shyshkina V.V., Medvedeva N.A., Medvedev O.S. Effect of hydrogen inhalation on cardiovascular and interstitial components of pulmonary hypertension in rats. *Pul'monologiya*. 2024; 34 (1): 19–30 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-1-19-30

Легочная гипертензия (ЛГ) — заболевание малого круга кровообращения, характеризующееся увеличением среднего артериального давления (АД) в кровеносной системе легких более чем на 25 мм рт. ст. При ЛГ у пациентов наблюдаются эндотелиальная дисфункция с повышенной реактивностью легочных сосудов к сосудосуживающим факторам, ремоделирование и пролиферация как эндотелиальных, так и гладкомышечных клеток, а также тромбообразование. В результате наблюдается окклюзия мелких легочных артерий, приводящая к увеличению сопротивления легочных сосудов с последующим развитием гипертрофии правого желудочка (ПЖ) сердца, ПЖ-недостаточностью и преждевременной смертью [1]. Согласно клинической классификации, предложенной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), эта группа гетерогенных заболеваний подразделяется на 5 подтипов, которые различаются этиологией и фенотипом [2]. Однако принятая классификация скорее свидетельствует о состояниях разных органов, ассоциированных с исследуемой патологией, и не всегда отражает патофизиологические механизмы возникновения исследуемого заболевания. С этим связаны трудности моделирования ЛГ в экспериментах на животных. Одной из самых изучаемых групп указанной классификации является III, в которую входит гипертензия малого круга кровообращения, ассоциированная с различными патологиями легких, как в острой, так и в хронической форме. Интерстициальные заболевания легочной системы (ИЗЛ), связанные с воспалительными процессами и появлением

фиброза, приводят к нарушению вентиляционно-перфузионного соотношения и гипоксии.

В последнее время широко обсуждается стратегия и медикаментозные подходы к лечению ИЗЛ, ассоциированных с ЛГ. Показано, что при терапии, направленной на коррекцию ИЗЛ, улучшается качество жизни пациентов с ЛГ и уменьшаются суммарные расходы на их лечение [3]. На животных моделях заболевания этого типа при изучении возможных терапевтических способов коррекции предлагается использовать монокроталиновую (МКТ) модель ЛГ (МКТ-ЛГ). Среди доклинических моделей ЛГ на модели МКТ-ЛГ продемонстрированы ключевые аспекты ЛГ у человека, включая ремоделирование сосудов, пролиферацию гладкомышечных клеток, эндотелиальную дисфункцию, воспаление и фиброз в легких. Кроме того, изучены многие молекулярные механизмы, составляющие основу патогенеза ЛГ [4]. Одним из важных факторов, стимулирующих процессы воспаления и фиброза в легких, является окислительный стресс. Показано, что именно окислительный стресс способствует индукции и сохранению трансформирующего фактора роста-1 (TGF-1) индуцированного легочного фиброза [5]. В связи с этим использование препаратов с антиоксидантным и противовоспалительным действием может оказать положительный лекарственный эффект, вызывая снижение риска развития основных симптомов развития ИЗЛ и ассоциированной с ней ЛГ, что способствует продлению жизни пациентов и улучшению ее качества.

Молекулярный водород (H_2) считается одним из идеальных селективных антиоксидантов, не имеющих ограничений в диапазоне вводимой дозы и не оказывающих токсического эффекта [6]. Показано, что при значительном снижении уровня $\bullet OH$ в клетках водород не оказывает влияния на клеточные уровни сигнальных $\bullet O_2^-$, H_2O_2 и $\bullet NO$, поскольку высокая окислительная активность $\bullet OH$ позволяет гидроксильному радикалу реагировать с инертной молекулой H_2 , в то время как значительно более низкая окислительная активность $\bullet O_2^-$, H_2O_2 и $\bullet NO$ недостаточна для реакций с H_2 [7, 8]. Следовательно, водород может уменьшать окислительный стресс и корректировать окислительно-восстановительный статус клеток, не изменяя при этом физиологические процессы, протекающие в клетках [9].

Отмечено, что свойства водорода заключаются не только в способности связывать гидроксильный радикал, но и в ингибировании провоспалительных и воспалительных цитокинов, при этом водород оказывает влияние на их синтез и внутриклеточные пути реализации сигналов. Эти данные позволяют рассматривать водород как молекулу-регулятор внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающих координацию биохимических процессов, протекающих в клетках организма [10, 11].

Целью исследования явилось изучение эффектов ингаляции 4%-го молекулярного водорода в атмосферном воздухе на степень развития МКТ-ЛГ и симптомов развития ИЗЛ в экспериментах на крысах.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар (масса тела — 180–220 г; возраст — 2 мес.). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принципами Директивы Европейского совета

86/609/ЕЭС. Животные были получены из вивария Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (Москва, Россия). Крысы содержались в условиях 12-часового светового дня при свободном доступе к воде и пище, осуществлялся контроль влажности и температуры. Период адаптации после транспортировки составлял не менее 7 дней. В дальнейшем крысы взвешивались, у них дважды измерялось систолическое АД плетизмографическим методом.

Для моделирования МКТ-ЛГ в 1-й день животным обеих групп однократно подкожно вводился МКТ (60 мг / кг в 60%-ном этиловом спирте) (*Sigma-Aldrich*, Германия). Животным контрольной группы подкожно вводился только растворитель для МКТ (60%-ный этиловый спирт), т. е. эти животные являлись контролем для изучения действия МКТ [12].

Животные, получавшие инъекцию МКТ, были разделены на 2 подгруппы:

- крысы 1-й подгруппы дышали комнатным воздухом (МКТ-контроль);
- крысы 2-й подгруппы — смесью комнатного воздуха и 4%-ного водорода (МКТ + H_2).

Ингаляции были постоянными в течение 21 дня.

В ходе эксперимента крысы помещались в 130-литровые пластиковые контейнеры (SAMLА 203.764.41, *Inter IKEA Systems*). Использованы 3 контейнера. Внутри каждого контейнера располагались 2 клетки Т2 для лабораторных животных, в каждой из которых находились по 4 крысы. Для вентиляции контейнеров использовали воздушный компрессор *Hiblow XP 40* (*Techno C.O. Takatsuki*, Япония). Для создания воздушной смеси и водорода использовался генератор молекулярного водорода модели «Пионер» (компания «Водородпомогает», Россия). На рис. 1 представлена схема экспериментальной установки.

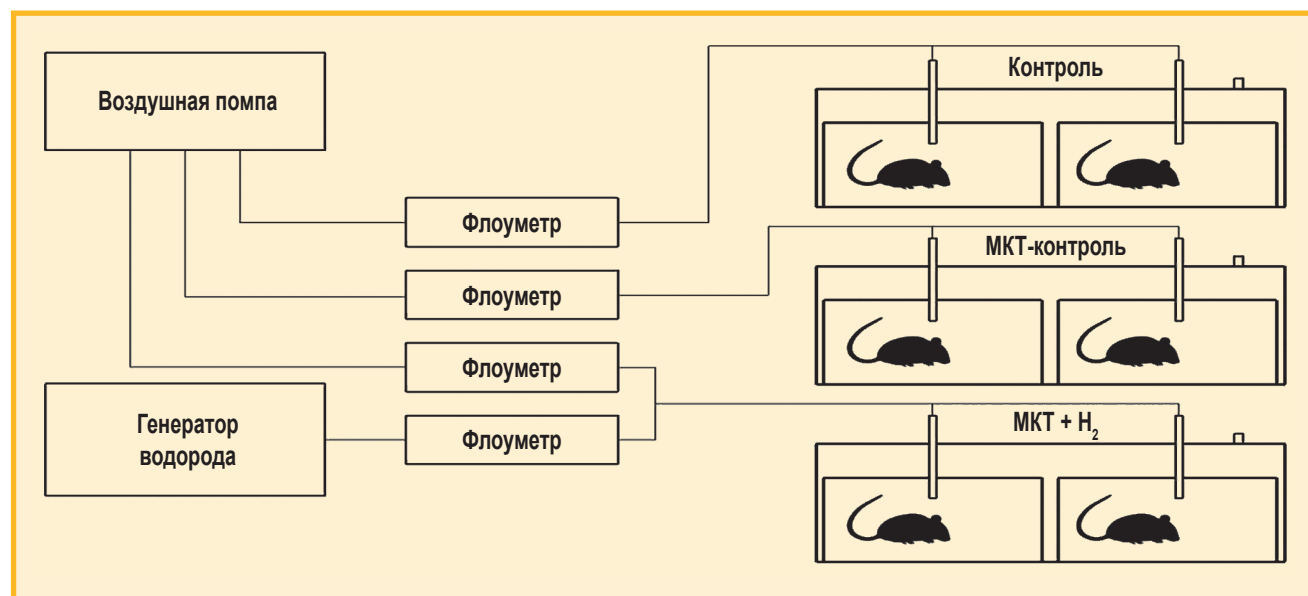


Рис. 1. Схема экспериментальной установки

Примечание: МКТ — монокроталин.

Figure 1. Experimental setup diagram

Клетки вентилировались воздухом, содержащим 4%-ный водород. Для получения подобной смеси использовался поток водорода от генератора водорода (скорость — 150 мл / мин). Воздух подавался со скоростью 4 мл / мин. Скорость каждого из потоков измерялась ротаметрами (LZB-3, LZM-4Т, Китай). В ходе экспериментов измерялась концентрация H_2 . Показано, что на выходе из трубки его содержание составляло $4,1 \pm 0,3$ %.

Для регистрации гемодинамических параметров в экспериментах *in vivo* у животных выполнялась анестезия уретаном (1,2 г / кг) внутривенно. Среднее АД и систолическое давление в правом желудочке (СДПЖ) оценивались непосредственно с помощью датчика АД *Statham* (*Statham Instrument Inc.*, США), операционного усилителя, многоканального аналого-цифрового преобразователя (L-Card E140, Россия) с записью на компьютере. Для этого наркотизированным крысам вводился катетер PE 10 в бедренную артерию и катетер PE 50 («Медсил», Москва, Россия) — в правую яремную вену, в ПЖ — под контролем регистрации кривой давления. Степень развития ЛГ определялась по величине СДПЖ и гипертрофии ПЖ сердца, степень гипертрофии ПЖ — по сумме масс левого желудочка (ЛЖ) и межжелудочковой перегородки (МЖП) (ПЖ / (ЛЖ + МЖП)) в условных единицах. Дополнительно измерялась масса легких.

Ткани легких для морфологического анализа выделялись сразу после эвтаназии животных путем передозировки ингаляционного анестезирующего препарата Изофлюран с дальнейшим извлечением органокомплекса трахеи и легких и незамедлительной фиксацией в 10%-ном нейтральном формалине. В дальнейшем образцы легких подвергались стандартной процедуре пробоподготовки. Полученные поперечные срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, растворами Май-Грюнвальда и Гимзы методом пикро-Маллори для идентификации фиброзных изменений легочной паренхимы. Иммуногистохимически определялась секреция триптазы тучных клеток (ТК) с использованием мышиных моноклональных антител к триптазе ТК (#ab2378, разведение 1 : 4000, *Abcam*, Великобритания). Для оценки фиброзных процессов легочной ткани использовалось определение TGF- β_1 (EPR21143) (#ab215715, разведение 1 : 500, *Abcam*, Великобритания). Все гистологические срезы анализировались слепым способом с использованием микроскопа *Zeiss Imager.A2* и программы *ImagePro*. Анализ микропрепаратов производился по 30 полям зрения при увеличении $\times 200$.

Данные, собранные в ходе эксперимента, представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение (M \pm SD). Статистический анализ данных проводился в программах *Statistica 12.0* (*Statistica Inc.*, США) и *GraphPad Prism 8.0*. Проверка нормальности распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Анализ One-Way ANOVA использовался для определения наличия статистически значимых различий по одному фактору между средними значениями ≥ 3 независимых групп. Для установления од-

новременного влияния группы и продолжительности воздействия, а также оценки взаимодействия между этими факторами использовался двухфакторный дисперсионный анализ *Two-way ANOVA*. Для сравнения ранговых данных использовался тест Краскела–Уоллиса. Исключение статистических выбросов проводилось с использованием критерия ROUT при $Q \leq 1$ %. Качественные данные описывались абсолютными (n) и относительными частотами (%). В качестве статистически значимого рассматривался уровень достоверной вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты

При изучении величины СДПЖ сердца крыс показано, что в группах МКТ этот показатель выше более чем на 50 % СДПЖ в группе контроля, где она составляла 37 ± 5 мм рт. ст. ($p < 0,05$; рис. 2А), что свидетельствует о развитии ЛГ у животных групп МКТ. При сравнении величин СДПЖ между животными групп МКТ-контроль и МКТ + H_2 различий не показано, что свидетельствует об отсутствии влияния дыхания 4%-ным H_2 на этот симптом развития МКТ-ЛГ. Так, у крыс группы МКТ-контроля величина СДПЖ составляла 57 ± 9 мм рт. ст., а группы МКТ + H_2 — 58 ± 9 мм рт. ст. Различий по частоте сердечных сокращений между крысами всех групп не отмечено (см. рис. 2В). Также не отмечено влияния H_2 на относительную массу ПЖ ($p > 0,05$), увеличенную вследствие развития ЛГ, что является вторым симптомом развития МКТ-ЛГ (рис. 3).

С учетом того, что при МКТ-ЛГ продемонстрированы все признаки ЛГ, ассоциированной с ИЗЛ, проведен морфологический и иммунохимический анализ некоторых маркеров ИЗЛ у животных с МКТ-ЛГ как на фоне дыхания H_2 , так и без такового.

При морфологическом анализе срезов ткани левого легкого, окрашенных гематоксилином и эозином, у животных групп МКТ выявлены патологические изменения, присущие ЛГ (рис. 4). У всех животных группы МКТ отмечены признаки ремоделирования сосудов в виде гипертрофии меди артерий, дилатационных повреждений стенок сосудов. Наличие тромбов сочеталось с развитием фиброза легочной ткани, наблюдалось сужение просвета артериол, отмечались признаки хронического воспаления, ткани легкого периваскулярно и перибронхиально были диффузно инфильтрированы иммунокомпетентными клетками. По результатам морфологического анализа образцов, полученных от животных группы МКТ + H_2 , показано, что структуры ацинуса приобретали классическую форму, альвеолы имели ячеистый вид и немного утолщенные стенки с полнокровными капиллярами в интерстиции (см. рис. 4). Участки ремоделированного внеклеточного матрикса стромы легких располагались более рыхло, волокна соединительной ткани были неупорядоченно ориентированы, в данных локусах встречались немногочисленные воспалительные клетки.

Одним из основных признаков ИЗЛ является развитие воспалительного процесса и поддержание про-

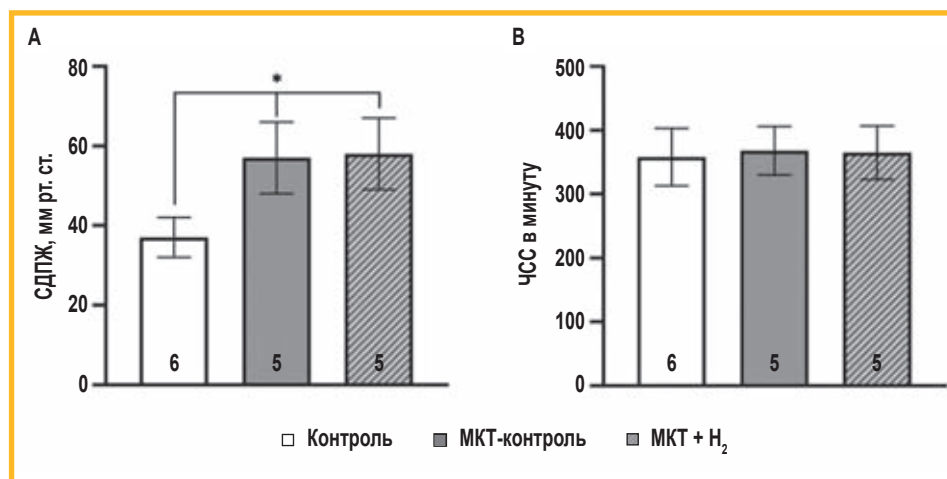


Рис. 2. А – систолическое давление в правом желудочке сердца крысы; В – частота сердечных сокращений во всех экспериментальных группах на 21-й день эксперимента

Примечание: СДПЖ – систолическое давление в правом желудочке; МКТ – монокроталин; ЧСС – частота сердечных сокращений.

Figure 2. A – Systolic pressure in the right ventricle of rat heart; B – Heart rate in all experimental groups on the 21st day of the experiment

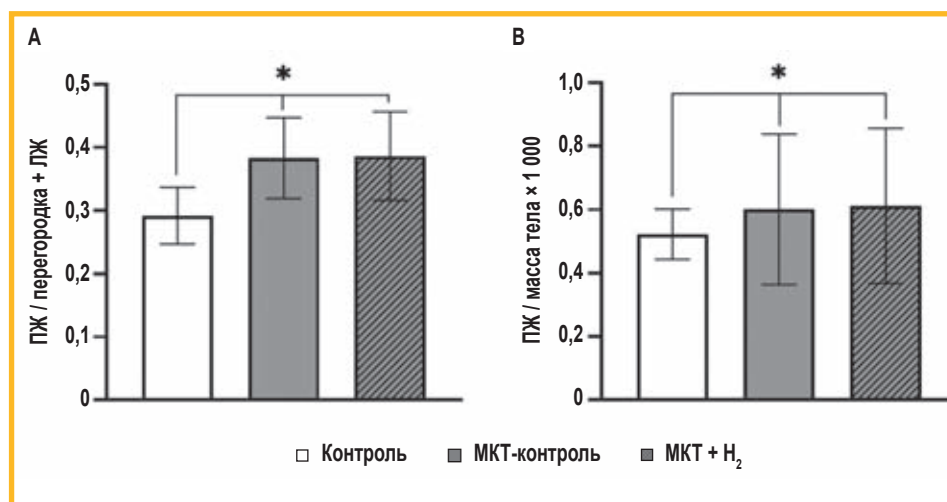


Рис. 3. Индексы гипертрофии правого желудочка сердца крысы на 21-й день эксперимента

Примечание: ПЖ – правый желудочек; ЛЖ – левый желудочек; МКТ – монокроталин; * – контроль vs монокроталин-контроль, монокроталин + H₂ ($p < 0,05$); One way ANOVA.

Figure 3. Indices of hypertrophy of the right ventricle of rat heart on the 21st day of the experiment
Note: *, control vs monocrotaline-control, monocrotaline + H₂ ($p < 0.05$); One-way ANOVA.

воспалительного фона. Особая роль в данном аспекте принадлежит ТК. Количественный анализ клеточной популяции проведен путем окрашивания растворами Май–Грюнвальда и Гимзы, а также методом иммуногистохимической реакции на триптазу ТК. В легких группы МКТ-контроль наибольшая активность ТК с признаками дегрануляции наблюдалась в участках развивающегося фиброза, а также вокруг стенозированных сосудов. Экспрессия ТК триптазы была достоверно выше по сравнению с таковой у животных группы контроля с признаками дегрануляции различной степени (рис. 5). Повышенная секреция TGF- β иммунопозитивными клетками (рис. 6D, 7) в сравнении с таковой у животных группы контроля и МКТ + H₂, по-видимому, инициировалась цитокинами и хемокинами, в т. ч. триптазой ТК, и опосредовала дифференцировку фибробластов в миофибробласты, более активно вырабатывающие компоненты внеклеточного матрикса.

В легких животных группы МКТ + H₂ реакция ТК проявила себя как количественным, так и функциональным снижением по сравнению с таковым у животных группы МКТ-контроль (см. таблицу и рис. 5). Выявлена тенденция к снижению экспрессии триптазы ТК с преобладанием функциональных форм без признаков дегрануляции (по сравнению с группой МКТ-контроля). По результатам гисто-

химического анализа показано, что количество ТК (включая содержащие триптазы) в группе МКТ + H₂ было в среднем на 30 % ниже по сравнению с таковым у животных группы МКТ-контроля (см. табл. 2), $p < 0,05$.

Вторым важным симптомом развития ИЗЛ является развитие фиброза. При окрашивании по методу пикро-Маллори выявлены сосудистые изменения, протекающие на фоне действия МКТ: в крупных ветвях легочной артерии происходило ремоделирование волокнистых компонентов соединительной ткани в адвентициальной оболочке с формированием признаков фиброза. У животных группы МКТ + H₂ по результатам анализа микропрепаратов, окрашенных по методу пикро-Маллори, фиброза выраженной степени не выявлено. Отмечены явления ремоделирования адвентициальной стенки крупных ветвей легочной артерии с формированием фиброзных узелков. Секреция TGF- β альвеолярными макрофагами и альвеолоцитами II типа у животных группы МКТ-контроль была высокой (см. рис. 3) в сравнении с таковой у животных групп контроля и МКТ + H₂. Секреция TGF- β у животных группы МКТ + H₂ была значимо снижена по сравнению с таковой у животных группы МКТ-контроля ($p < 0,05$) (см. рис. 7) и визуализировалась единичными клетками в альвеолярных ячеистых структурах (см. рис. 6F).

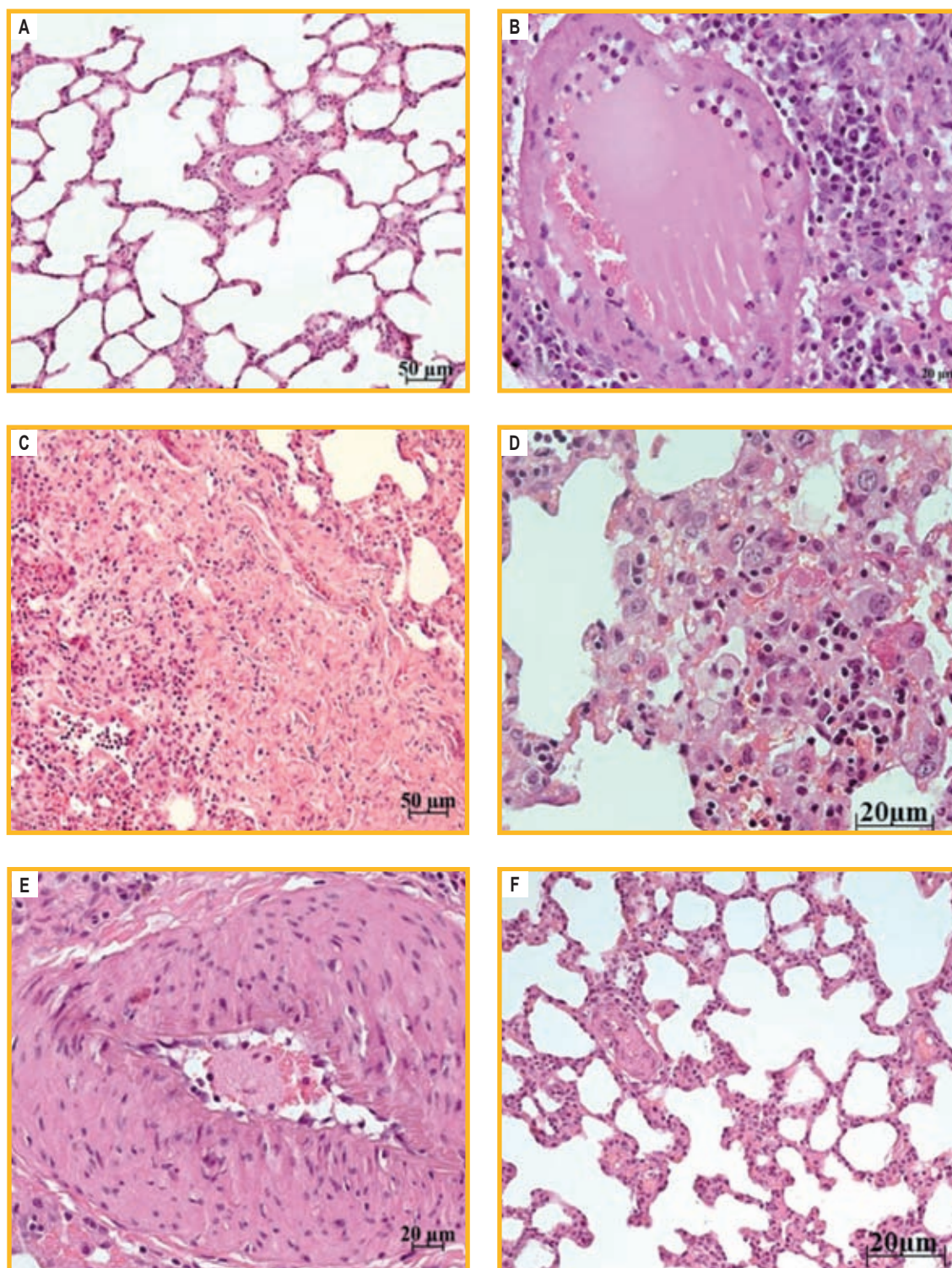


Рис. 4. Гистологическое строение структур легкого крыс линии *Wistar*. А – контрольной группы (в респираторном отделе легкого определяются вытянутые альвеолярные ходы, которые переходят в тонкостенные альвеолы, в межалвеолярных перегородках встречаются единичные макрофаги); В–D – у крыс, получавших монокроталин (В – истонченная стенка артерии с дилатационными признаками повреждения, краевым стоянием гранулоцитов и периваскулярным воспалительным инфильтратом; С – признаки ремоделирования легочной паренхимы, фибромиксоидный участок интенсивно инфильтрированный воспалительными элементами; D – скопления альвеолярных макрофагов и десквамированные альвеолоциты в просвете); E – структурно-функциональные изменения стенки артерии с гипертрофией меди; F – группы получающих монокроталин + H₂ (менее выраженный отек интерстициальных перегородок, пневмоциты с признаками гипертрофии); окрашивание гематоксилином и эозином; А, С – $\times 200$, В, D–F – $\times 400$

Figure 4. Histology of the lung structures of Wistar rats: A – Control group (in the respiratory part of the lung, elongated alveolar ducts are determined, turning into thin-walled alveoli; single macrophages are found in the interalveolar septa); B–D – The group of rats receiving monocrotaline (B – Thinned arterial wall with dilated signs of damage, margination of granulocytes and perivascular inflammatory infiltrate; C – Signs of remodeling of the pulmonary parenchyma; the fibromyxoid area is intensively infiltrated with inflammatory elements; D – Aggregates of alveolar macrophages and desquamated alveolocytes in the lumen); E – Structural and functional changes in the artery wall with media hypertrophy; F – Groups receiving monocrotaline + H₂ (less pronounced swelling of the interstitial septa, pneumocytes with signs of hypertrophy); hematoxylin and eosin staining; A, C – $\times 200$, B, D–F – $\times 400$

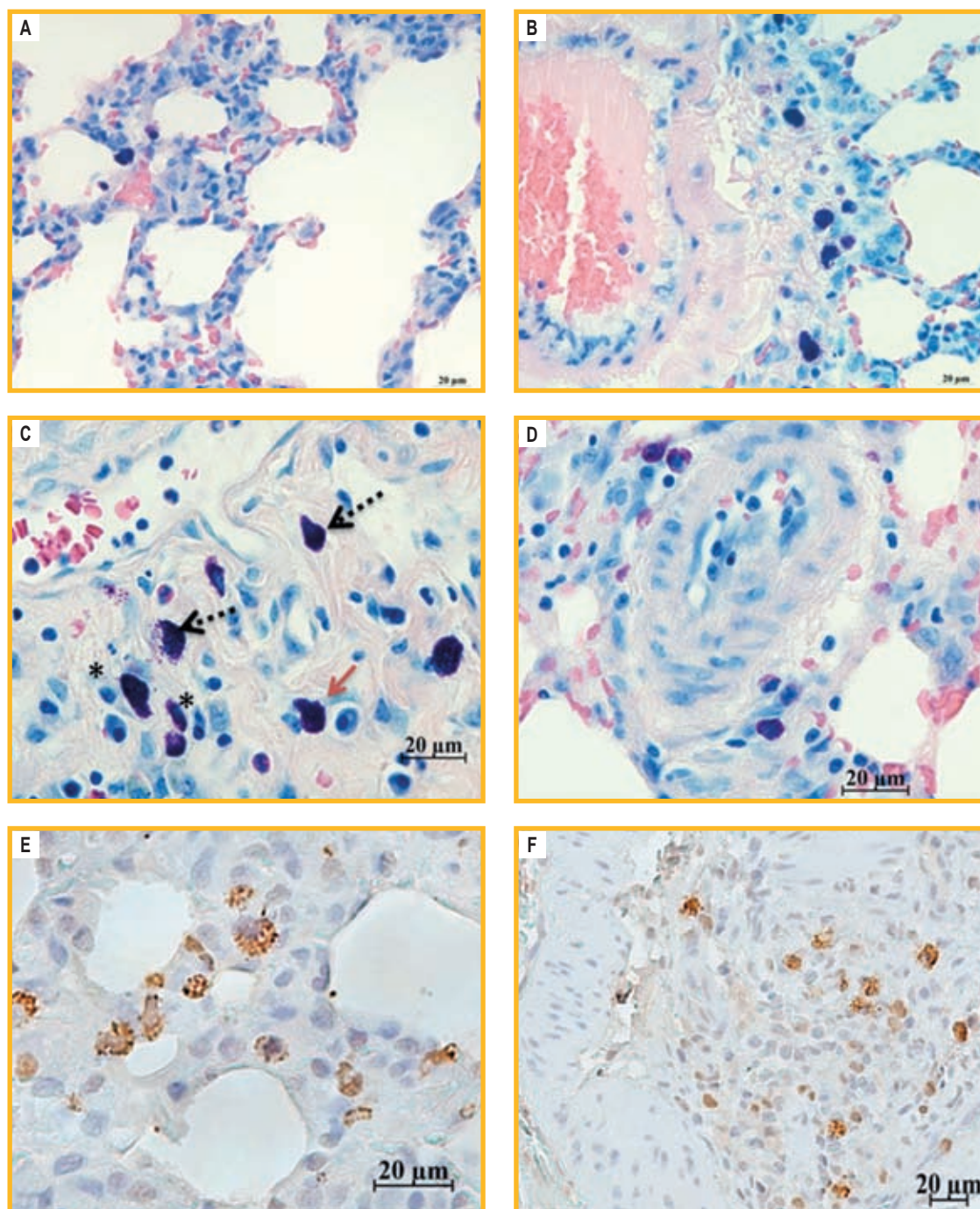


Рис. 5. Тучные клетки в структурах легкого крыс линии *Wistar*: А — контрольной группы (тучные клетки легкого немногочисленны, локализованы периваскулярно и перибронхиально, в большинстве либо без, либо с дегрануляцией слабой степени); С, F — группы крыс, получавших монокроталин; В, D, E — группы крыс, получавших монокроталин + H₂; В — артерия с признаками ремоделирования стенки, в адвентициальной оболочке определяются тучные клетки с дегрануляцией слабой степени; С — тучные клетки в измененном участке паренхимы легкого интенсивно инфильтрируют перикапиллярные пространства, активно выводят компоненты секрета в межклеточное пространство, часто сококализованы с воспалительными клетками (красная стрелка), коллагеновыми волокнами (черная прерывистая стрелка) и представителями фибробластического дифферона (*); D — периваскулярное расположение тучных клеток без признаков дегрануляции вокруг артериолы с признаками гипертрофии меди I стадии; E — триптаза-позитивные тучные клетки в межальвеолярных септах с признаками слабой дегрануляционной активности; F — триптаза-позитивные тучные клетки в измененном участке паренхимы легкого, активно секретирующие протеазу с формированием провоспалительного локуса. Методика: А–D — окрашивание по Май-Грюнвальду и Гимзе; E, F — иммуногистохимическая реакция с мышиными моноклональными антителами к триптазе тучных клеток (#ab2378, разведение 1 : 4 000, Abcam, Великобритания), ядра докрашены гематоксилином Майера; × 800

Figure 5. Mast cells in the lung structures of Wistar rats: A — Control group (lung mast cells are few in number, localized perivascularly and peribronchially, most without degranulation or with mild degranulation); C, F — MKT groups; B, D, E — MKT+H₂ groups; B — Artery with signs of wall remodeling, mast cells with mild degranulation in the adventitia; C — Mast cells in the altered area of the lung parenchyma intensify infiltrate the pericapillary spaces, actively remove secretome components into the intercellular space, and are often colocalized with inflammatory cells (red arrow), collagen fibers (black broken arrow) and representatives of fibroblastic differon (*); D — Perivascular location of mast cells without signs of degranulation around the arteriole with signs of stage I media hypertrophy; E — Tryptase-positive mast cells in intervalveolar septa with signs of mild degranulation; F — Tryptase-positive mast cells in the altered area of the lung parenchyma, actively secreting protease with the formation of a pro-inflammatory locus. Methodology: A–D — May-Grunwald and Giemsa staining; E, F — Immunohistochemical reaction with mouse monoclonal antibodies to mast cell tryptase (#ab2378, dilution 1 : 4 000, Abcam, UK), the nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin; × 800

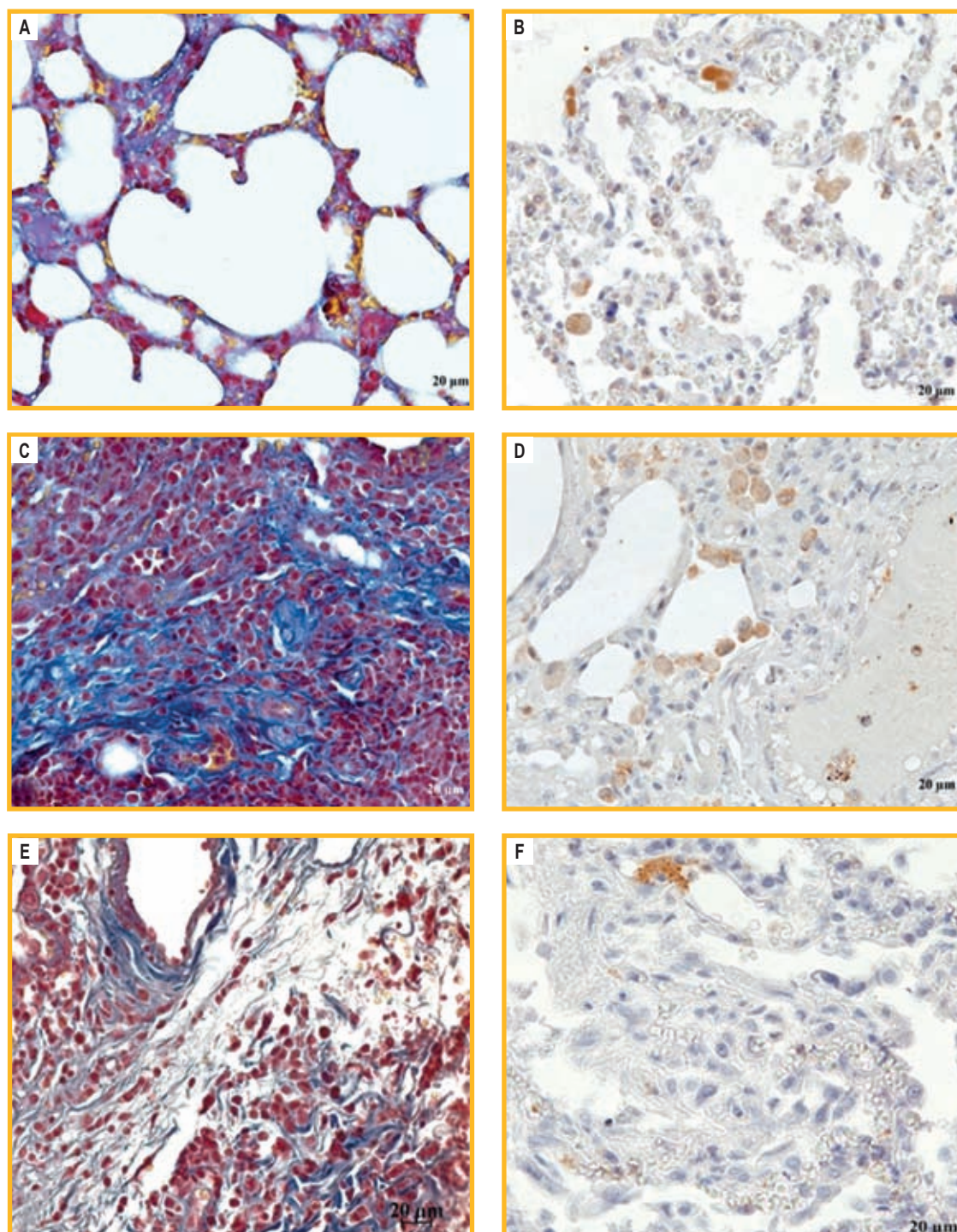


Рис. 6. Ремоделирование соединительнотканной стромы легкого у крыс линии *Wistar* при легочной гипертензии: А, В – группа контроля; С, D – группа крыс, получавших монокроталин; Е, F – группа крыс, получавших монокроталин + H₂. А – альвеолярная структура легкого без признаков легочной гипертензии; В – TGF-β₁ иммунопозитивные клетки, выполняющие многочисленные нормальные физиологические функции; С – очаговый участок фиброобразования с выраженной многоклеточностью (коллагеновые волокна окрашиваются синим цветом); D – клеточные элементы (преимущественно макрофаги) с различным уровнем экспрессии TGF-β₁; Е – тонкие, неупорядоченно расположенные волокнистые элементы стромы легкого, создающие «рыхлый» вид ремоделированного участка, встречаются единичные представители фибробластического дифферона; F – низкий уровень экспрессии TGF-β₁, обусловленный ингибирующим действием H₂. Методика: окрашивание по методу пикро-Маллори (А, С, Е) и иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TGF-β₁, ядра докраснены гематоксилином Майера (В, D, F) (#ab215715, разведение 1 : 500, Abcam, Великобритания); × 400
Примечание: TGF (*Transforming growth factor*) – трансформирующий фактор роста.

Figure 6. Remodeling of the connective tissue stroma of the lung in Wistar rats with pulmonary hypertension: A, B – Control group; C, D – Group of rats receiving monocrotaline; E, F – Group of rats receiving monocrotaline + H₂. A – Alveolar structure of the lung without signs of pulmonary hypertension; B, TGF-β₁ – Immunopositive cells that perform numerous normal physiological functions; C – Focal area of fibrosis with pronounced multicellularity (collagen fibers are colored blue); D – Cellular elements (mainly macrophages) with different levels of TGF-β₁ expression; E – Thin, randomly arranged fibrous elements of the lung stroma, creating a “loose” appearance of the remodeled area; there are single representatives of fibroblastic differon; F – Low TGF-β₁ expression due to the inhibitory effect of H₂. Methodology: Picro-Mallory staining with antibodies to TGF-β₁; the nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin (B, D, F) (#ab215715, dilution 1 : 500, Abcam, UK); × 400

Таблица
Среднее количество тучных клеток в ткани легких
на 30 полей зрения ($\times 20$)

Table
Average number of mast cells in lung tissue per 30 fields
of view ($\times 20$)

Группа	n	Окрашивание по Гимзе	Окрашивание триптаз
		ТК, среднее количество на 30 полей зрения ($\times 20$)	
Контроль	7	26 \pm 9*	23 \pm 6*
МКТ-контроль	6	52 \pm 14	40 \pm 13
МКТ + H ₂	6	36 \pm 13**	28 \pm 10**

Примечание: ТК – тучные клетки; МКТ – монокроталин; * – контроль vs монокроталин-контроль, монокроталин + H₂ ($p < 0,05$); ** – монокроталин + H₂ vs монокроталин-контроль ($p < 0,05$); One way ANOVA.

Note: *, control vs monocrotaline control, monocrotaline + H₂ ($p < 0.05$); **, monocrotaline + H₂ vs monocrotaline control ($p < 0.05$); One way ANOVA.

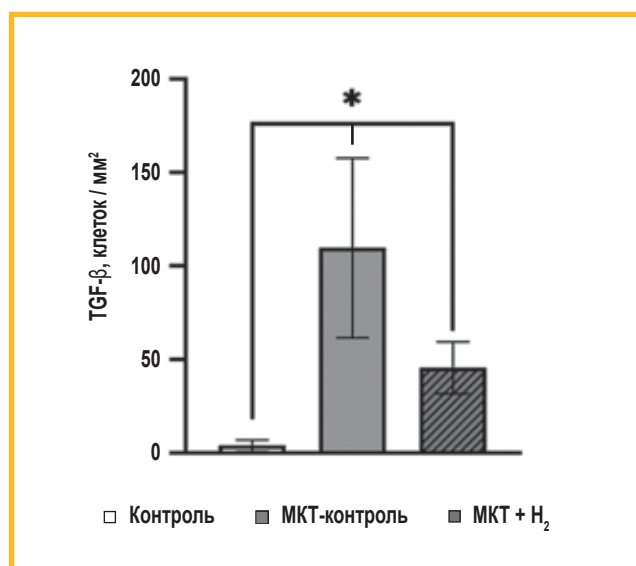


Рис. 7. Среднее количество TGF-β-позитивных клеток в ткани легких на 21-й день эксперимента

Примечание: TGF (Transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста; МКТ – монокроталин; * – контроль vs монокроталин-контроль, монокроталин + H₂, монокроталин-контроль + H₂ vs монокроталин-контроль ($p < 0,00001$); One way ANOVA.

Figure 7. Average number of TGF-β-positive cells in the lung tissue on the 21st day of the experiment

Note: TGF, transforming growth factor; *, control vs monocrotaline-control, monocrotaline + H₂, monocrotaline-control + H₂ vs monocrotaline-control ($p < 0.00001$); One way ANOVA.

Обсуждение

Продемонстрированы антиоксидантные и противовоспалительные свойства молекулярного водорода и положительные эффекты при различных заболеваниях [13–15]. По данным настоящего исследования изучено влияние ингаляций 4%-го водорода в смеси с атмосферным воздухом на симптомы развития МКТ-ЛГ, морфологию и маркеры воспаления и фиброза в легких у экспериментальных крыс. Несмотря на данные литературных источников об успешном применении водорода при развитии ЛГ [16–18], по ре-

зультатам настоящего исследования подобных эффектов добавления 4%-го водорода к атмосферному воздуху на основные симптомы развития ЛГ – СДПЖ и гипертрофию ПЖ – не показано. Это может быть связано с использованием насыщенной водородом воды или внутрибрюшинным введением физраствора, насыщенного H₂. Возможно, что различия с результатами ранее выполненных исследований связаны с различием в кинетике водорода при разных способах введения [19, 20].

Однако несмотря на отсутствие влияния на основные параметры развития ЛГ, выявлено протективное действие ингаляции 4%-го водорода на морфологические изменения в легких, уровень фиброза и воспалительного процесса в них. Отмечено, что МКТ-ЛГ можно рассматривать как модель ЛГ, относящуюся к III группе ЛГ по клинической классификации ВОЗ, ассоциированной с одним из заболеваний легких – ИЗЛ [4]. Одними из основных симптомов развития ИЗЛ являются фиброз и развитие воспаления [21, 22]. По данным гистологического исследования показано, что при применении постоянных ингаляций 4%-го молекулярного водорода в течение 21 дня снизилась степень и частота появления фиброза в легочной ткани. Одним из факторов, стимулирующих появление фиброза, является окислительный стресс, стимулирующий увеличение выработки цитокинов и хемокинов и трансформирующего фактора роста-β (TGF-β1) [23, 24]. Показано, что в группе крыс, получавших МКТ + H₂ и дышавших воздухом с 4%-ным H₂, секреция TGF-β альвеолярными макрофагами и альвеолоцитами II была снижена более чем в 2 раза. По-видимому, эффект объясняется антиоксидантными и противовоспалительными свойствами молекулярного водорода.

Развитие МКТ-ЛГ сопровождается активацией воспалительного процесса, который также является одним из симптомов ИЗЛ. Показано, что на фоне действия МКТ наблюдается увеличение числа ТК в ткани легких, которые вносят вклад в ремоделирование легочной ткани. При дегрануляции ТК высвобождают широкий спектр медиаторов, которые классифицируются на 3 группы, включая предварительно сформированные медиаторы (в т.ч. гистамин, триптазу и химазу), медиаторы *de novo*: простагландин D2, лейкотриен B4 и D4, а также многочисленные цитокины и факторы роста, такие как фактор некроза опухоли, TGF-β, фактор роста эндотелия сосудов, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкины (IL)-10, IL-8, IL-5, IL-3 и IL-1 [25]. При фиброзных заболеваниях легких взаимодействие между ТК и фибробластами способствует формированию профиброзной среды, в которой фибробласты поддерживают выживание и пролиферацию ТК, продуцируя *Stem cell factor*; в свою очередь, химаза, происходящая из ТК, активирует латентный TGF-β1, который опосредует дифференцировку фибробластов в миофибробласты [25, 26]. С помощью компонентов секрета ТК тесно интегрированы в генез адаптивных и патологических состояний, представляя собой не только информативный маркер прогрессирования заболевания, но и пер-

спективную терапевтическую мишень. Важную роль играют специфические протеазы ТК, такие как триптазы [25]. Известно, что число ТК, выделяющих триптазу, увеличивается и коррелируют с тяжестью ЛГ и ремоделированием легочных сосудов [27]. При ингаляции 4%-го водорода уменьшается количество ТК, в т. ч. содержащих триптазу, что подтверждает противовоспалительные свойства водорода.

Применение молекулярного водорода в виде ингаляций представляет собой терапевтический подход, который находит все более широкое распространение благодаря своей простоте и доступности [28]. По результатам настоящего исследования данных за влияние ингаляций водорода на симптомы развития МКТ ЛГ не установлено, однако получены убедительные данные о том, что при этих ингаляциях уменьшается развитие фиброза и воспалительного процесса — симптомов ИЗЛ, ассоциированной с ЛГ. Показано, что при снижении риска развития ИЗЛ улучшаются качество жизни пациентов и ее продолжительность за счет восстановления перфузионно-вентиляционного отношения, уменьшения потребности в кислороде, повышения функциональной способности и толерантности к физической нагрузке [6], а также снижаются расходы системы здравоохранения на лечение пациентов [29]. Представляется перспективным при использовании ингаляционных подходов применять комбинированную газовую терапию. Известно, что ингаляции оксидом азота широко используются для лечения ЛГ [30].

Заключение

Таким образом, полученные данные могут служить дополнительным обоснованием использования ингаляций как водородом, преимущественно оказывающим влияние на процессы развития воспаления и фиброгенеза, так и оксидом азота, обладающим мощным сосудорасширяющим действием. При одновременном использовании ингаляций оксида азота и молекулярного водорода для терапевтического воздействия как на ЛГ, так и ИЗЛ можно не только улучшать качество жизни пациентов, но и бороться с тяжелым и трудно поддающимся лечению заболеванием малого круга кровообращения — ЛГ.

Литература / References

- Poch D., Mandel J. Pulmonary hypertension. *Ann. Intern. Med.* 2021; 174 (4): ITC49–64. DOI: 10.7326/AITC202104200.
- Simonneau G., Gatzoulis M., Adatia I. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 62 (25, Suppl.): D34–41. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.029.
- Waxman A., Elia D., Adir Y. et al. Recent advances in the management of pulmonary hypertension with interstitial lung disease. *Eur. Respir. Rev.* 2022; 31 (165): 210220. DOI: 10.1183/16000617.0220-2021.
- Nogueira-Ferreira R., Vitorino R., Ferreira R., Henriques-Coelho T. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: a network approach. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2015; 35: 8–16. DOI: 10.1016/j.pupt.2015.09.007.
- Cui Y., Robertson J., Maharaj S. et al. Oxidative stress contributes to the induction and persistence of TGF- β 1 induced pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011; 43 (8): 1122–1133. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.04.005.
- Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K. et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007; 13 (6): 688–694. DOI: 10.1038/nm1577.
- Iida A., Nosaka N., Yumoto T. et al. The clinical application of hydrogen as a medical treatment. *Acta Med. Okayama.* 2016; 70 (5): 331–337. DOI: 10.18926/amo/54590.
- Liu C., Zhang K., Chen G. Hydrogen therapy: from mechanism to cerebral diseases. *Med. Gas Res.* 2016; 6 (1): 48–54. DOI: 10.4103/2045-9912.179346.
- Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol. Ther.* 2014; 144 (1): 1–11. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.04.006.
- Ge L., Yang M., Yang N. et al. Molecular hydrogen: a preventive and therapeutic medical gas for various diseases. *Oncotarget.* 2017; 8 (60): 102653–102673. DOI: 10.18632/oncotarget.21130.
- Huang L. Molecular hydrogen: a therapeutic antioxidant and beyond. *Med. Gas Res.* 2016; 6 (4): 219–222. DOI: 10.4103/2045-9912.196904.
- Шогенова Л.В., Чыонг Т.Т., Крюкова Н.О. и др. Ингаляционный водород в реабилитационной программе медицинских работников, перенесших COVID-19. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2021; 20 (6): 2986. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2986. / Shogenova L.V., Truong T.T., Kryukova N.O. et al. [Hydrogen inhalation in rehabilitation program of the medical staff recovered from COVID-19]. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika.* 2021; 20 (6): 2986. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2986 (in Russian).
- Nicolson G., de Mattos G., Settineri R. et al. Clinical effects of hydrogen administration: from animal and human diseases to exercise medicine. *Int. J. Clin. Med.* 2016; 7 (1): 32–76. DOI: 10.4236/ijcm.2016.71005.
- Liu L., Shi Q., Liu X. et al. Attenuation of myocardial fibrosis using molecular hydrogen by inhibiting the TGF- β signaling pathway in spontaneous hypertensive rats. *Am. J. Hypertension.* 2022; 35 (2): 156–163. DOI: 10.1093/ajh/hpab159.
- Nakayama M., Itami N., Suzuki H. et al. Novel haemodialysis (HD) treatment employing molecular hydrogen (H₂)-enriched dialysis solution improves prognosis of chronic dialysis patients: a prospective observational study. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 254. DOI: 10.1038/s41598-017-18537-x.
- Kishimoto Y., Kato T., Ito M. et al. Hydrogen ameliorates pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and antioxidant effects. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2015; 150 (3): 645–654. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2015.05.052.
- Wang Y., Jing L., Zhao X.M. et al. Protective effects of hydrogen-rich saline on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in a rat model. *Respir. Res.* 2011; 12 (1): 26. DOI: 10.1186/1465-9921-12-26.
- He B., Zhang Y., Kang B. et al. Protection of oral hydrogen water as an antioxidant on pulmonary hypertension. *Mol. Biol. Rep.* 2013; 40 (9): 5513–5521. DOI: 10.1007/s11033-013-2653-9.
- Sano M., Ichihara G., Katsumata Y. et al. Pharmacokinetics of a single inhalation of hydrogen gas in pigs. *PLoS One.* 2020; 15 (6): e0234626. DOI: 10.1371/journal.pone.0234626.
- Ichihara G., Katsumata Y., Moriyama H. et al. Pharmacokinetics of hydrogen after ingesting a hydrogen-rich solution: a study in pigs. *Heliyon.* 2021; 7 (11): e08359. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021. e08359.
- Wijsenbeek M., Suzuki A., Maher T. Interstitial lung diseases. *Lancet.* 2022; 400 (10354): 769–786. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01052-2.
- Kuropatkina T., Pavlova O., Gulyaev M. et al. Sex-dependent protective effect of combined application of solubilized ubiquinol and Selenium on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in Wistar rats. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11 (3): 1–16. DOI: 10.3390/antiox11030549.
- Otapalova E., Smith S., Cheng G., Thannickal V.J. Oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Compr. Physiol.* 2020; 10 (2): 509–547. DOI: 10.1002/cphy.c190017.
- Ohta S. Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic application. *Curr. Pharm. Des.* 2011; 17 (22): 2241–2252. DOI: 10.2174/138161211797052664.

25. Komi D., Mortaz E., Amani S. et al. The role of mast cells in IgE-Independent lung diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2020; 58 (3): 377–387. DOI: 10.1007/s12016-020-08779-5.
26. Atiakshin D., Kostin A., Volodkin A. et al. Mast cells as a potential target of molecular hydrogen in regulating the local tissue microenvironment. *Pharmaceuticals* (Basel). 2023; 16 (6): 817. DOI: 10.3390/ph16060817.
27. Shi J., Duncan B., Kuang X. Hydrogen treatment: a novel option in liver diseases. *Clin. Med. (Lond.)*. 2021; 21 (2): e223–227. DOI: 10.7861/clinmed.2020-0370.
28. Farha S., Sharp J., Asosingh K. et al. Mast cell number, phenotype, and function in human pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* 2012; 2 (2): 220–228. DOI: 10.4103/2045-8932.97609.
29. Tsang Y., Panjabi S., Funtanilla V. et al. Economic burden of illness among patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) associated with connective tissue disorders (CTD). *Pulm. Circ.* 2023; 13 (2): e12218. DOI: 10.1002/pul2.12218.
30. Liu H., Liang X., Wang D. et al. Combination therapy with nitric oxide and molecular hydrogen in a murine model of acute lung injury. *Shock*. 2015; 43 (5): 504–511. DOI: 10.1097/shk.0000000000000316.

Поступила: 28.10.23

Принята к печати: 11.12.24

Received: October 28, 2023

Accepted for publication: December 11, 2023

Информация об авторах / Authors Information

Куропаткина Татьяна Анатольевна — к. б. н., лаборант кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; аналитик Центра трансфера медицинских технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (923) 422-21-33; e-mail: 0sylphide0@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1027-8703>)

Tatiana A. Kuropatkina, Candidate of Biology, Laboratory Assistant, Department of Pharmacology, Faculty of Fundamental Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation; analyst, Medical Technology Transfer Centre, Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expertise of Medical Products” of the Ministry of Health of Russia; tel.: (923) 422-21-33; e-mail: 0sylphide0@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1027-8703>)

Гуфранов Хайдар Фаисович — аспирант кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; тел.: (985) 773-37-68; e-mail: haidar@formed.ru

Khaidar F. Gufranov, Postgraduate Student, Department of Pharmacology, Faculty of Fundamental Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation; tel.: (985) 773-37-68; e-mail: haidar@formed.ru

Сычев Федор Юрьевич — студент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; тел.: (931) 312-84-71; e-mail: sychev.sychevfedor2018@gmail.com

Fedor Yu. Sychev, Student, Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation; tel.: (931) 312-84-71; e-mail: sychev.sychevfedor2018@gmail.com

Артёмьева Марина Михайловна — к. б. н., научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных биологического факультета и кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; тел.: (916) 904-92-85, e-mail: marinka.artemieva@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6646-2254>)

Marina M. Artemyeva, Candidate of Biology, Researcher, Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology and Department of Pharmacology, Faculty of Fundamental Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation; tel.: (916) 904-92-85, e-mail: marinka.artemieva@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6646-2254>)

Бондаренко Григорий Николаевич — научный сотрудник кафедры органической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; тел.: (916) 632-63-29; e-mail: grig_bondarenko@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-3280>)

Grigoriy N. Bondarenko, Researcher, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the

Russian Federation; tel.: (916) 632-63-29; e-mail: grig_bondarenko@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-3280>)

Есауленко Дмитрий Игоревич — к. м. н., старший научный сотрудник научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н.Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (473) 243-76-88; e-mail: desaulyenko79@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-8834>)

Dmitriy I. Esaulenko, Candidate of Medicine, Senior Researcher, Research Institute of Experimental Biology and Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “N.N.Burdenko Voronezh State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; tel.: (473) 243-76-88; e-mail: desaulyenko79@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-8834>)

Самойленко Татьяна Валерьевна — научный сотрудник научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н.Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (920) 220-88-65, e-mail: antailkka@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9990-535X>)

Tatyana V. Samoilenko, Researcher, Research Institute of Experimental Biology and Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “N.N.Burdenko Voronezh State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; tel.: (920) 220-88-65, e-mail: antailkka@mail.ru (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9990-535X>)

Шишкина Виктория Викторовна — к. м. н., директор Научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н.Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (473) 243-76-88; e-mail: 4128069@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9185-4578>)

Viktoriya V. Shishkina, Candidate of Medicine, Director, Research Institute of Experimental Biology and Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “N.N.Burdenko Voronezh State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; tel.: (473) 243-76-88; e-mail: 4128069@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9185-4578>)

Медведева Наталия Александровна — д. б. н., профессор, ведущий научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; тел.: (903) 610-72-06; e-mail: namedved@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-6781>)

Natalia A. Medvedeva, Doctor of Biology, Professor, Leading Researcher, Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State University, The Government of the Russian Federation; tel.: (903) 610-72-06; e-mail: namedved@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-6781>)

Медведев Олег Стефанович — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Правительства Российской Федерации; заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н.Смирнова Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И.Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (903) 745-62-08; e-mail: oleg.omedvedev@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8942-4851>)

Oleg S. Medvedev, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Pharmacology, Faculty of Fundamental Medicine, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V.Lomonosov Moscow State

University, The Government of the Russian Federation; Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Scientific Research Institute of Experimental Cardiology named after Academician V.N.Smirnov, Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Centre of Cardiology named after Academician E.I.Chazov" of the Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: (903) 745-62-08; e-mail: oleg.omedvedev@gmail.com (ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8942-4851>)

Участие авторов

Куропаткина Т.А. — проведение эксперимента, уход за животными, сбор биоматериала и данных, статистический анализ и интерпретация данных, структурирование материала и написание статьи

Гуфранов Х.Ф. — проведение эксперимента, сбор биоматериала и данных, статистический анализ и интерпретация данных, структурирование материала и написание статьи

Сычев Ф.Ю. — проведение эксперимента, уход за животными

Артемьева М.М. — проведение эксперимента, сбор биоматериала и данных

Бондаренко Г.Н. — разработка и изготовление экспериментальной установки

Есауленко Д.И. — проведение морфологических исследований, подсчет результатов, статистическая обработка, написание рукописи

Смайленко Т.В. — проведение морфологических исследований, подсчет результатов, статистическая обработка, написание рукописи

Шишкина В.В. — проведение морфологических исследований, подсчет результатов, статистическая обработка, написание рукописи, окончательное утверждение рукописи для публикации

Медведева Н.А. — разработка концепции и дизайна исследования, участие в написании текста статьи, обсуждение рукописи и проверка содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации

Медведев О.С. — разработка концепции и дизайна исследования, обсуждение рукописи и проверка содержания, окончательное утверждение рукописи для публикации

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации, несут ответственность за целостность всех частей статьи.

Authors Contribution

Kuropatkina T.A. — conducting the experiment, animal care, collection of biomaterial and data, statistical analysis and interpretation of the data, structuring the material and writing the article

Gufranov Kh.F. — conducting the experiment, collecting biomaterial and data, statistical analysis and interpretation of the data, structuring the material and writing the article

Sychev F.Yu. — experiment realization, animal care

Artemieva M.M. — conducting the experiment, collecting biomaterial and data

Bondarenko G.N. — design and manufacture of the experimental setup

Esaenko D.I. — conducting morphologic studies, calculation of results, statistical processing, writing the manuscript

Samoylenko T.V. — morphologic studies, analyze of results, statistical processing, manuscript writing

Shishkina V.V. — morphologic studies, analyze of results, statistical processing, manuscript writing, final approval of the manuscript for publication

Medvedeva N.A. — conceptualization and design of the study, participation in writing the text of the article, manuscript discussion and content checking, final approval of the manuscript for publication

Medvedev O.S. — conceptualization and design of the study, manuscript discussion and content review, final approval of the manuscript for publication

All authors made a significant contribution to the search, analysis, and preparation of the article, read and approved the final version before publication, and accepted responsibility for the integrity of all parts of the article.