

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ
Экспериментальные исследования

ORIGINAL ARTICLES
Experimental investigations

© О.Н. Береснева, М.М. Парастаева, Г.Т. Иванова, М.И. Зарайский, С.А. Орлова, А.Г. Кучер, 2022
УДК [616.61-08 : 615.874.2 : 635.655]-092.4

doi: 10.36485/1561-6274-2022-26-4-110-118

**МИОКАРДИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ МАЛОБЕЛКОВОЙ ДИЕТЫ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕК**

*Ольга Николаевна Береснева¹✉, Марина Магрезовна Парастаева¹,
Галина Тажимовна Иванова², Михаил Игоревич Зарайский^{1,3},
Светлана Александровна Орлова¹, Анатолий Григорьевич Кучер¹*

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

¹ beresnevaolga@list.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7532-2405>

² marina_parastaeva@list.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4526-8671>

³ tazhim@list.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0188-5173>

⁴ mzaraiski@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7605-4369>

⁵ orlova_s_2001@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0515-2575>

⁶ prof.kucher@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5616-3488>

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ: оценить влияние МБД, дополненной кетостерилом, на морфологические и эпигеномные изменения в миокарде крыс линии Wistar с моделируемой дисфункцией почек. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Работа выполнена на самцах крыс линии Wistar, подвергнутых ⁵/₆ нефрэктомии (НЭ). Первая группа после НЭ получала стандартную диету (20,16% животного белка), вторая – малобелковую диету (МБД), включающую 10% кетостерола. Контрольные крысы получали стандартную диету. Через 4 мес у крыс оценивали артериальное давление (АД), индекс массы левого желудочка (ИМЛЖ), выполняли гистологическое исследование миокарда. В миокарде определяли относительные уровни экспрессии NF-κB, микроРНК-21, микроРНК-133, микроРНК-203. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Через 4 мес у крыс с НЭ на стандартной диете регистрировался рост АД, увеличение индекса массы миокарда ЛЖ. МБД с включением 10% кетостерола замедляла рост систолического АД и развитие гипертрофии миокарда ЛЖ у крыс с дисфункцией почек. На гистологическом уровне применение МБД обеспечило снижение степени гипертрофии кардиомиоцитов и дистрофических изменений в кардиомиоцитах. У животных, получавших МБД, отмечен менее выраженный диффузный и периваскулярный фиброз в сравнении с крысами, получавшими обычный корм. Применение МБД замедляло рост относительного уровня экспрессии гена NFκB и микроРНК-21 в миокарде крыс с НЭ и способствовало росту уровня экспрессии микроРНК-133 и микроРНК-203 по сравнению с показателями у животных с НЭ, получавших стандартный корм. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** длительное использование МБД с применением кетоаналогов незаменимых аминокислот может оказывать потенциальный кардиопротективный эффект при ХБП, замедляя рост АД, увеличение массы миокарда ЛЖ и формирование структурных изменений в миокарде. Возможно, существенную роль в этом может играть снижение экспрессии NF-κB и микроРНК-21, а также повышение экспрессии микроРНК-203 и 133 в миокарде.

Ключевые слова: почечная дисфункция, малобелковая диета, миокард, экспрессия NFκB, экспрессия микроРНК

Для цитирования: Береснева О.Н., Парастаева М.М., Иванова Г.Т., Зарайский М.И., Орлова С.А., Кучер А.Г. Миокардиальные эффекты малобелковой диеты при экспериментальной дисфункции почек. *Нефрология* 2022;26(4):110-118. doi: 10.36485/1561-6274-2022-26-4-110-118

**MYOCARDIAL EFFECTS OF A LOW-PROTEIN DIET IN EXPERIMENTAL
KIDNEY DYSFUNCTION**

*Olga N. Beresneva¹✉, Marina M. Parastaeva¹, Galina T. Ivanova²,
Mikhail I. Zaraiski^{1,3}, Svetlana A. Orlova¹, Anatoly G. Kucher¹*

¹ First Pavlov St.-Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia;

² Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

¹ beresnevaolga@list.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7532-2405>² marina_parastaeva@list.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4526-8671>³ tazhim@list.ru; <https://orcid.org/000-0003-0188-5173>⁴ mzaraiski@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7605-4369>⁵ orlova_s_2001@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0515-2575>⁶ prof.kucher@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5616-3488>

ABSTRACT

THE AIM: to evaluate the effect of low protein diet supplemented with ketosteril on morphological and epigenomic changes in the myocardium of Wistar rats with simulated kidney dysfunction. **MATERIALS AND METHODS.** The work was performed on male Wistar rats subjected to $5/6$ nephrectomy (NE). The first group after NE received a standard diet (20.16% animal protein), the second – low protein diet (LPD), including 10% ketosteril. Control rats received a standard diet. After 4 months, blood pressure (BP) and left ventricular mass index (LVMI) were assessed in rats, and a histological examination of the myocardium was performed. In the myocardium, the relative expression levels of NF- κ B, miRNA-21, miRNA-133, and miRNA-203 were determined. **RESULTS.** After 4 months in rats with NE on a standard diet, an increase in blood pressure, an increase in the mass index of the LV myocardium was recorded. MBD with the inclusion of 10% Ketosteril slowed down the growth of systolic blood pressure and the development of LV myocardial hypertrophy in rats with kidney dysfunction. At the histological level, the use of LPD provided a decrease in the degree of hypertrophy of cardiomyocytes and degenerative changes in cardiomyocytes. Animals treated with LPD had less pronounced diffuse and perivascular fibrosis compared with animals fed normal food. The use of MBD slowed down the increase in the relative level of expression of the NF- κ B gene and miRNA-21 in the myocardium of rats with NE and promoted an increase in the expression level of miRNA-133 and miRNA-203 compared to the indices of animals with NE that received standard food. **CONCLUSION:** long-term use of LPD with the use of ketoanalogues of essential amino acids can have a potential cardioprotective effect in CKD, slowing down the growth of blood pressure, an increase in LV myocardial mass and the formation of structural changes in the myocardium. It is possible that a decrease in the expression of NF- κ B and miRNA-21, as well as an increase in the expression of miRNA-203 and 133 in the myocardium, can play a significant role in this.

Keywords: renal dysfunction, low-protein diet, myocardium, NF κ B expression, microRNA expression

For citation: Beresneva O.N., Parastaeva M.M., Ivanova G.T., Zaraiski I.M.I., Orlova S.A., Kucher A.G. Myocardial effects of a low-protein diet in experimental kidney dysfunction. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2022;26(4):110-118 (In Russ.). doi: 10.36485/1561-6274-2022-26-4-110-118

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания и нарушения обмена веществ являются основными осложнениями хронической болезни почек (ХБП), и часто метаболические изменения способствуют прогрессированию патологии миокарда и сосудов. Высокий риск развития сердечно-сосудистых нарушений отмечается на самых ранних стадиях ХБП и увеличивается по мере прогрессирования дисфункции почек. Патологические процессы в миокарде при ХБП включают развитие гипертрофии кардиомиоцитов, интерстициального миокардиального фиброза, изменение капиллярного ложа [1, 2]. Гипертрофию и фиброз миокарда рассматривают в качестве основных причин нарушения коронарного кровообращения и расслабления левого желудочка [3].

Для пациентов с ХБП диетические воздействия остаются эффективным средством замедления прогрессирования дисфункции почек. Следует отметить, что у людей с уменьшенным количеством функционирующих нефронов высокое потребление животного белка может привести к дальнейшей потере нефронов из-за гемодинамического повреждения гломерулярных капилляров. [4]. Фактически, когда люди с нормальной функцией почек переходят от низкого к высокому потреблению животного белка, почечный крово-

ток и скорость клубочковой фильтрации (СКФ) у них могут увеличиться до 30% [5]. Вегетарианцы обычно имеют более низкую СКФ по сравнению с людьми, потребляющими животный протеин [4, 6]. Кроме того, переход от обычной мясной диеты на вегетарианское питание приводит к значимому снижению АД у пациентов с нормальной функцией почек. Показано также, что диеты с очень низким содержанием белка на 35% снижают риск развития терминальной стадии ХБП в популяции людей с заболеванием почек. Однако МБД требует добавления незаменимых аминокислот (АК) с целью обеспечения адекватного потребления калорий и макронутриентов [6].

Для предотвращения дефицита АК используют препараты, включающие незаменимые АК и их кетоаналоги, в частности кетостерил. Применение таких препаратов уменьшает содержание животного белка в рационе и снижает гломерулярную гиперфильтрацию. Кроме того, в данных препаратах часть незаменимых аминокислот представлены в виде кетоаналогов, позволяя снизить поступление азота в составе АК [7].

Малобелковую диету (МБД) с ограничением потребления животных протеинов (0,3–0,6 г белка/кг/сут) и добавлением кетоаналогов АК рекомендуют пациентам 4–5-й стадии ХБП с целью уменьшения уремических симптомов и отсрочки

начала заместительной почечной терапии. Важно отметить, что МБД в сочетании с кетоаналогами АК ограничивает потребление не только животного белка, но и хлорида натрия, фосфатов, позволяя уменьшить традиционные и нетрадиционные сердечно-сосудистые факторы риска [8].

Одним из интересных вопросов применения МБД является оценка вклада рационов с включением кетоаналогов незаменимых АК в кардиопротективные эффекты диетических воздействий у пациентов с ХБП. В клинических исследованиях показано, что МБД с добавлением кетоаналогов незаменимых АК снижает общий холестерин, липопротеиды низкой плотности, триглицериды, уменьшают концентрацию сывороточных свободных радикалов у пациентов с дисфункцией почек [9]. Наши предыдущие эксперименты также показали снижение уровня холестерина у крыс с НЭ, получавших МБД, дополненную препаратом «Кетостерил» [10]. МБД могут замедлять прогрессирование гломерулосклероза, так как доказано влияние гиперлипидемии на гломерулосклероз через опосредованное усиление синтеза простаглицина и тромбосана [11]. В экспериментах установлено, что изменение количества потребляемого с пищей белка влияет на скорость потери функции почек и в некоторых моделях у животных [12], а добавление в диету линоленовой кислоты улучшает функцию почек за счет усиления синтеза простаглицидов [9, 11].

Однако для дальнейшей оценки эффективности МБД, дополненной АК и их кетоаналогами, уточнения ее места среди других методов терапии ХБП и коррекции нарушений сердечно-сосудистой системы необходимы дополнительные исследования. В этой связи перспективными являются эксперименты, выполненные на животных. Целью настоящей работы являлась оценка влияния длительного применения МБД, дополненной кетостерилом, на морфологические и эпигеномные изменения в миокарде крыс линии Wistar с моделируемой дисфункцией почек.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные группы. Работа выполнена на взрослых самцах крыс стока Wistar (масса 230–260 г). В исследование включены три группы животных. В первую – контрольную группу (К) вошли 9 ложноперирированных (ЛО) крыс; во вторую – 8 животных, у которых с целью создания модели почечной дисфункции была выполнена резекция $\frac{5}{6}$ почечной ткани. Крысы этих двух групп ежедневно получали 28–30 г

сбалансированного лабораторного корма, содержащего: 20,16% полноценного животного белка, 85,3% углеводов, 1,03% кальция, 0,8% фосфата и 0,34% хлорида натрия. Суточное потребление белка одним животным в среднем составляло 6 г. Крысы третьей группы (n=12) после нефрэктомии (НЭ) получали МБД, включающую 10% комплекса незаменимых АК и их кетоаналогов (препарат «Кетостерил», «Fresenius Kabi», Германия). Срок исследования составил 4 мес после второго этапа оперативного вмешательства. Исследование выполнено в соответствии с принципами Базельской декларации при одобрении этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Модель дисфункции почек. В работе применена хирургическая модель хронической дисфункции почек – НЭ $\frac{5}{6}$ почечной паренхимы. Резекцию ткани почек выполняли в два этапа с интервалом в одну неделю. На первом этапе удаляли $\frac{2}{3}$ массы левой почки. На втором – удаляли всю правую почку. Контролем служили ЛО крысы. В качестве наркоза использовали ксилазин (0,05 мл) в сочетании с тилетамин/золазепамом (0,3 мл).

Регистрация систолического АД. В начале эксперимента и перед его окончанием у бодрствующих крыс измеряли систолическое АД манжеточным методом на хвосте, используя электроманометр фирмы «ELEMA» (Швеция). Выполняли три последовательных измерения и их среднее считали величиной АД.

Исследование экспрессии гена NF-κB. Для исследования экспрессии гена NF-κB использовали фрагмент ткани ЛЖ. Тотальную РНК выделяли фенол-хлороформным методом (набор «Рибозоль-А», фирма «Амплисенс», Россия). Приготовление кДНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции (набор «Реверта-Л-100», «Амплисенс», Россия) в модификации для рандомизированных олигопраймеров. Для этого использовали обратную транскриптазу M-MLV. Реакцию амплификации и детекцию результатов выполняли на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Проводили по две отдельные реакции для гена NF-κBp65 и гена GAPDH для каждой пробы. При проведении ПЦР-анализа использовали реакционную смесь с интеркалирующим красителем SYBRGREEN («Синтол», Россия). Применяли следующие последовательности праймеров: NF-κBp65F: 5-GTTCACAGACCTGGCATCC-3; NF-κBp65R: 5-TGTCACCTAGGCGAGTTATAGC-3; GAPDH-F: 5-TGGAAATCCCATCACCATCT-3; GAPDH-R: 5-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3.

Вычисление относительного уровня экспрессии гена NF-κB проводили по полуколичественному протоколу методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Определение уровней экспрессии микроРНК (миРНК-203, миРНК-21, миРНК-133) в миокарде заключалось в выделении тотальной РНК с помощью фенольного реактива (Trizol-LS) и последующей ее экстракцией хлороформом. Реакцию обратной транскрипции (РОТ) для приготовления «копийной» ДНК (кДНК) проводили по технологии «Stem Loop». Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen на амплификаторе DTLite-4 («ДНК-Технология», Москва). В ПЦР использовали следующие праймеры: микроРНК-21 – 5'-GCCCGTAGCTTATCAGACTGATG-3', микроРНК-133 – 5'-GCCCGCAGCTGGTAAAATGGAAC-3', микроРНК-203 – 5'-GCCGGTGAAATGTTTAGGACC-3' и U6 – 5'-GCGCGTCGTGAAGCGTTC-3', и общий обратный 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'. Реакционные смеси приготавливали отдельно для каждой кДНК. При расчетах применяли полуколичественную оценку уровня экспрессии микроРНК (в относительных единицах – ОЕ) по протоколу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (лабораторный референт- 0,09).

Индекс массы миокарда левого желудочка (ИМЛЖ, мг/г) рассчитывали как отношение массы миокарда ЛЖ (мг) к массе крысы (г).

Гистологическое исследование. Для гистологического анализа фрагменты миокарда фиксировали в 10% забуференном растворе формалина (24 ч при pH 7,0). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Ван-Гизону для оценки изменений компонентов стромы. Препараты изучали на микроскопе «Zeiss Axio Imager Z2» («Zeiss AG», Германия). Морфологическое и морфометрическое исследование выполняли с помощью цифровой фотокамеры «Nicon» и гистологического сканера («Leica Aperio AT2») в программе «VideoTest 5.2». Морфометрию проводили в 10 произвольно выбранных полях зрения. Анализировали следующие параметры: толщина (мкм) и площадь (мкм²) кардиомиоцитов, количество ядер в кардиомиоцитах, площадь соединительной ткани (мкм²), площадь периваскулярной соединительной ткани (мкм²), толщина стенки и диаметр просвета сосудов артериального типа (мкм). Оценку микроциркуляторного русла миокарда осуществляли иммуногистохимическим методом с антителами к белкам эндотелиальных клеток капилляров CD34 («Santa Cruz», США).

Результаты представлены в виде средних зна-

чений со стандартной ошибкой средней ($M \pm SE$) и как медиана [интерквартильный размах] ($Me [IQR]$). Для статистического анализа использовали t-критерий Стьюдента и критерий Манна-Уитни. Расчеты проводили в пакете прикладных компьютерных программ «STATISTICA 10.0». Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе проведена оценка длительного потребления МБД, включающей 10% препарата «Кетостерил», на состояние миокарда крыс с экспериментальной дисфункцией почек. Исходный уровень систолического АД у животных всех групп составлял в среднем 125 ± 5 мм рт. ст. Через 4 мес после НЭ у крыс на стандартной диете АД было существенно выше (в среднем на 26,8%, $p < 0,001$), чем у животных ЛО группы (130 ± 5 мм рт. ст.). МБД предотвращала рост АД у крыс с НЭ, его уровень значимо не отличался от показателя ЛО у животных (120 ± 5 мм рт. ст.). ИМЛЖ у крыс с НЭ (стандартный рацион) также возрастал ($2,63 \pm 0,12$) к 4 мес эксперимента относительно показателя К в группе (в среднем на 26,4%). В то же время, у животных, получавших МБД, этот показатель был значимо ниже ($1,96 \pm 0,22$, $p < 0,01$).

На гистологическом уровне применение МБД у крыс с НЭ обеспечило снижение степени гипертрофии кардиомиоцитов (толщина кардиомиоцитов: $9,3 \pm 1,7$ мкм) в сравнении с животными, получавшими стандартный корм ($14,2 \pm 2,9$ мкм; $p = 0,000$). На этом фоне также отсутствовали выраженные дистрофические изменения (глыбчатый распад миофибрилл, миоцитоллизис, разволокнение кардиомиоцитов) в кардиомиоцитах, которые наблюдались у крыс, получавших стандартный по белковому составу рацион после резекции $5/6$ почечной ткани. В группе крыс с НЭ, получавших МБД, выявлено также снижение площади ядер кардиомиоцитов ($26,2 \pm 4,3$ мкм²), увеличение показателя отношения толщины ядер кардиомиоцитов к толщине кардиомиоцитов ($0,38 \pm 0,14$) в сравнении с животными на стандартной диете ($34,1 \pm 7,2$ мкм²; $p = 0,072$ и $0,23 \pm 0,03$; $p = 0,000$ соответственно). Снижение показателя отношения толщины ядер кардиомиоцитов (мкм) к толщине кардиомиоцитов (мкм) в этой ситуации может быть обусловлено, в большей степени, снижением гипертрофии кардиомиоцитов. На рис. 1 представлены микрофотографии миокардов крыс с дисфункцией почек, получавших различные по белковому составу пищевые рационы. Выявлено

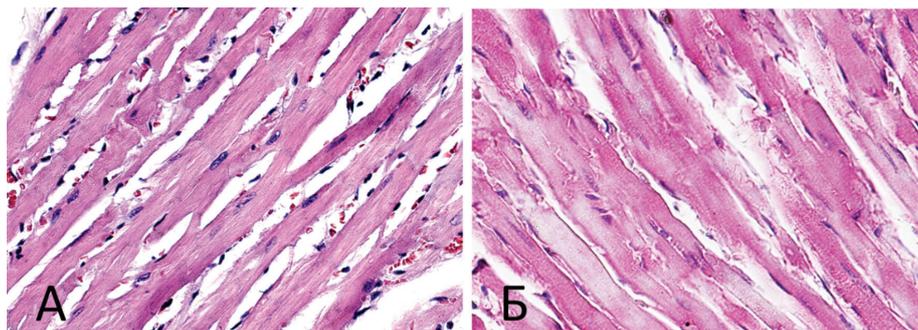


Рисунок 1. Микрофотография миокарда крыс через 4 мес после нефрэктомии. А – мало-белковая диета; Б – стандартный рацион (гематоксилин–эозин. Ув. 400).

Figure 1. Micrograph of rat myocardium 4 months after nephrectomy. A – low-protein diet; B – standard diet (hematoxylin-eosin, x400).

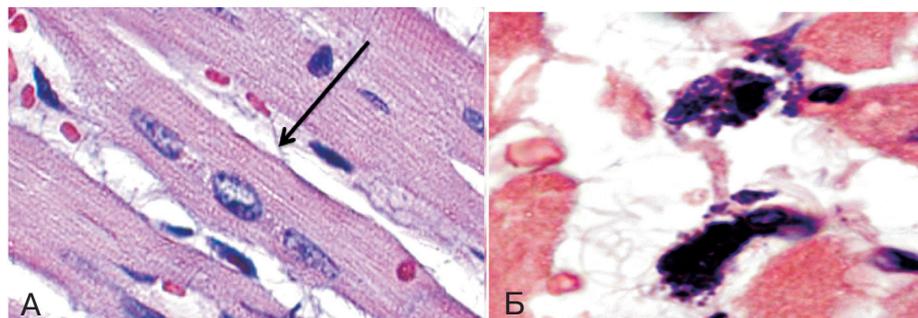


Рисунок 2. Микрофотография ядер кардиомиоцитов у крыс через 4 мес после нефрэктомии. А – трехядерный кардиомиоцит (гематоксилин–эозин. Ув. 400); Б – конденсация хроматина и деструкция ядер (гематоксилин–эозин. Ув. 1000).

Figure 2. Micrograph of cardiomyocyte nuclei in rats 4 months after nephrectomy. A – trinuclear cardiomyocyte (hematoxylin-eosin, x400); B – condensation of chromatin and destruction of nuclei, (hematoxylin-eosin, x1000).

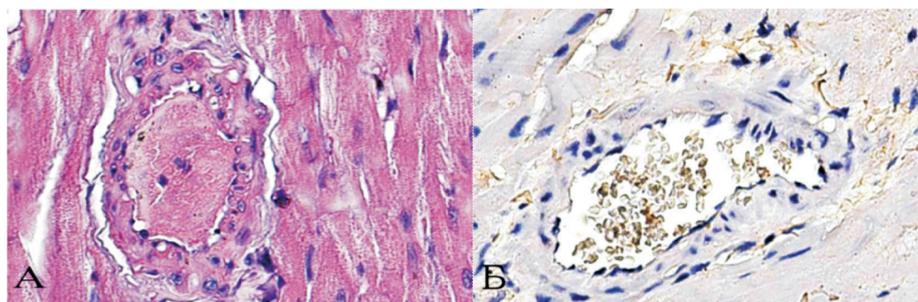


Рисунок 3. Микрофотография миокарда крысы с нефрэктомией, получавшей малобелковую диету (4 мес). Умеренный периваскулярный фиброз. А – гематоксилин–эозин. Ув. 400; Б – иммуногистохимическая реакция с антителами к CD34. Ув. 400.

Figure 3. Micrograph of the myocardium of a rat with nephrectomy receiving a low-protein diet (4 months). Moderate perivascular fibrosis. A – hematoxylin-eosin, x400; B – immunohistochemical reaction with antibodies to CD34, x400.

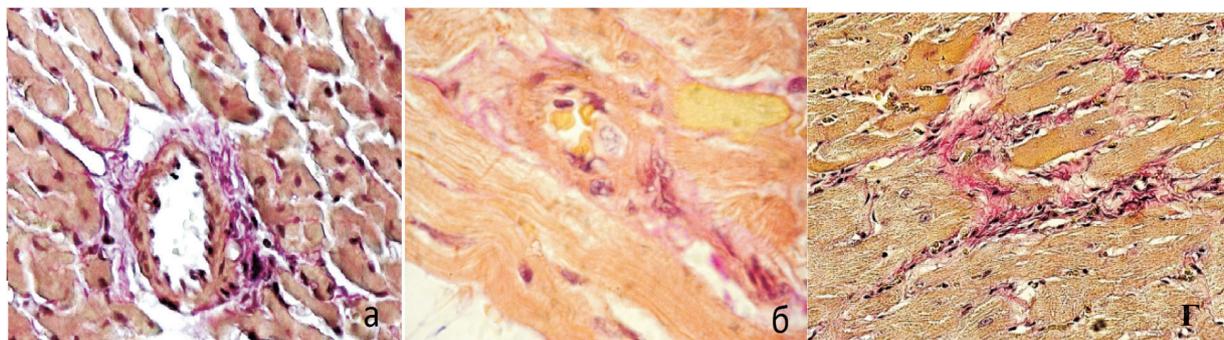


Рисунок 4. Микрофотография фиброза в миокарде крыс. Периваскулярный фиброз: а – контрольная группа, б – нефрэктомия, 4 мес (стандартная диета). Диффузный фиброз: г– нефрэктомия, 4 мес (стандартная диета) (пикрофуксин по Ван-Гизону. Ув. 400).
Figure 4. Micrograph of fibrosis in rat myocardium. Perivascular fibrosis: a – control group, б – nephrectomy, 4 months (standard diet). Diffuse fibrosis: г- nephrectomy, 4 months (standard diet), (picrofuchsin staining to van Gieson, x 400).

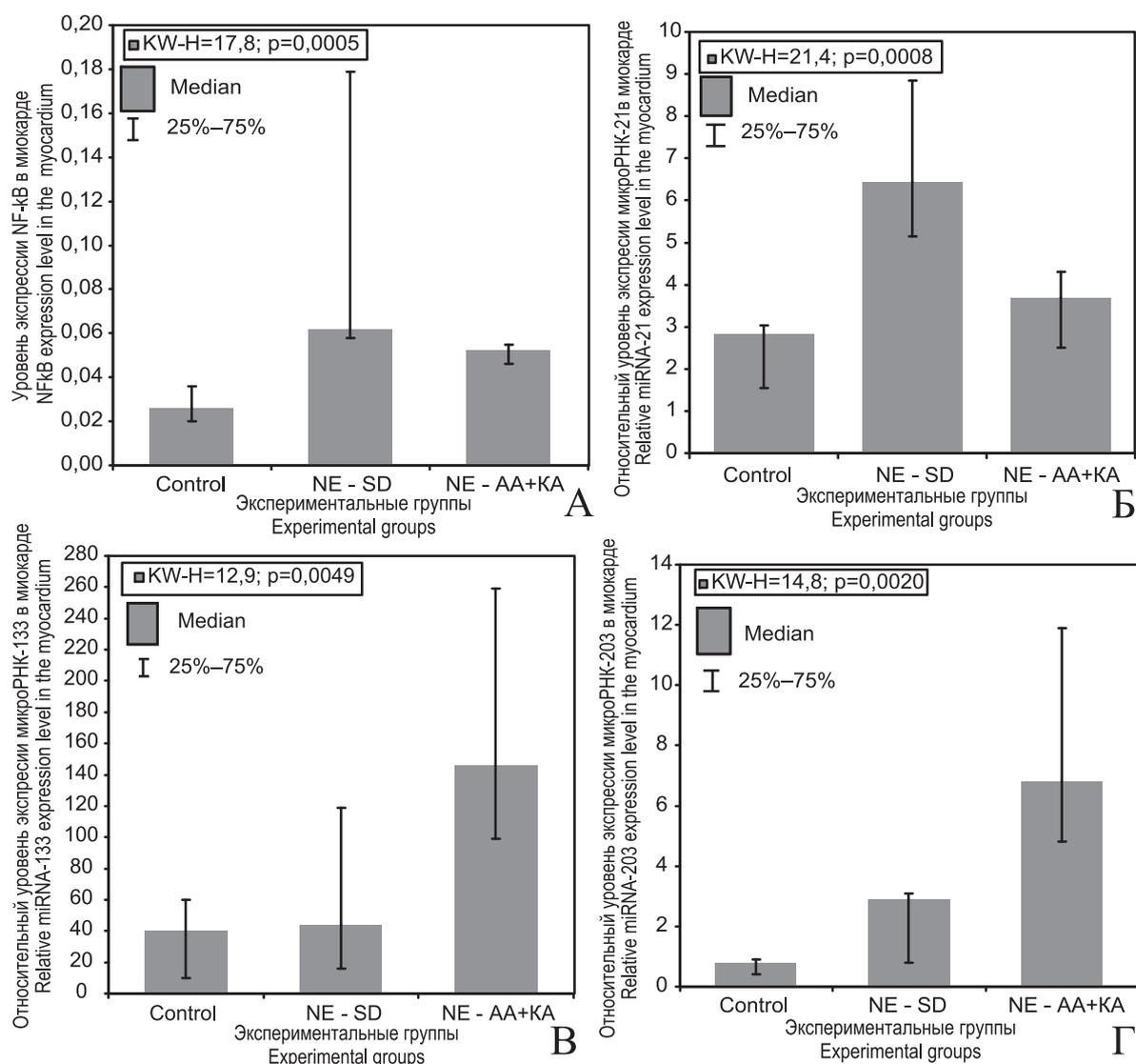


Рисунок 5. Уровень экспрессии гена NF-κB, микроРНК-21, микроРНК-133, микроРНК-203 в миокарде крыс с нефрэктомией, получавших стандартный рацион или МБД. Экспериментальные группы: Control – ЛО крысы (стандартный рацион), NE-SD – крысы с НЭ (стандартный рацион), NE-AA+AK – крысы с НЭ, получавшие МБД.

Figure 5. The level of expression of the NFκB gene, miRNA-21, miRNA-133, miRNA-203 in the myocardium of rats with nephrectomy receiving a standard diet or LPD. Experimental groups: Control - sham-operated rats (standard diet), NE-SD – rats after NE (standard diet), NE-AA+AK - rats after NE fed LPD.

отсутствие миоцитолита в цитоплазме кардиомиоцитов животного с НЭ, получавшего МБД (см. рис. 1А). Кроме того, если в группе крыс с НЭ на стандартной диете в миокарде наблюдались признаки ядерного полиморфизма – в одной клетке можно было встретить ядра различного размера с неправильными контурами и значительное количество (1%) многоядерных кардиомиоцитов (рис. 2), то у животных с НЭ, получавших МБД, многоядерных кардиомиоцитов было меньше (0,3%) и возросло число одноядерных кардиомиоцитов (97 против 92% соответственно).

Изменения стромального компонента миокарда при применении МБД характеризовались менее выраженным диффузным и периваскулярным фиброзом – средний показатель площади

соединительной ткани у крыс с НЭ, получавших МБД, составил $2837,6 \pm 1263,1$ мкм² в сравнении с животными, получавшими обычный корм – $4008,1 \pm 2185,7$ мкм²; $p=0,061$ (рис. 3, 4). Было отмечено снижение (более чем в 2 раза) показателя отношения площади капилляров (%) / площади кардиомиоцитов (%) (0,060) у крыс, получавших МБД, в сравнении с животными с НЭ на стандартном рационе (0,140). Этот факт обусловлен, главным образом, снижением площади, занятой соединительной тканью, до 12% ($2837,60 \pm 1263,19$ мкм²) и уменьшением общей площади поперечного сечения капилляров до 5% ($1061,1 \pm 78,3$ мкм²) у крыс, получавших МБД.

У крыс с МБД выявлено увеличение внутреннего диаметра просвета сосудов. Диаметр сосу-

дов составлял в среднем $89,6 \pm 14,2$ мкм, тогда как у животных с НЭ, получавших стандартный корм, – $60,9 \pm 17,9$ мкм ($p < 0,005$). Однако толщина стенки сосудов в группах с дисфункцией почек (МБД и НЭ – стандартный рацион – $28,9 \pm 7,1$ и $26,4 \pm 17,6$ мкм; $p > 0,05$) нарастала по сравнению с ЛО группой ($17,6 \pm 5,1$ мкм; $p < 0,05$).

Исследование показало, что структурные нарушения в миокарде крыс с дисфункцией почек сопровождаются эпигеномными изменениями. Уменьшение количества функционирующих нефронов у животных на стандартной диете приводило к росту уровня экспрессии гена NF-κB и микроРНК-21 в миокарде. В то же время, применение МБД с включением кетостерила замедляло рост относительного уровня экспрессии гена NF-κB и микроРНК-21 в миокарде крыс с НЭ (рис. 5А, Б) и способствовало росту уровня экспрессии микроРНК-133 и микроРНК-203 (см. рис. 5В, Г) по сравнению с показателями ЛО животных и крыс с НЭ, получавших стандартный корм.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что на данном сроке наблюдения МБД в сочетании с кетостерилом оказывает кардиопротективное действие у животных с экспериментальным уменьшением почечной паренхимы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что длительное потребление МБД с включением 10% комплекса незаменимых аминокислот и их кетоаналогов у крыс с НЭ сопровождается замедлением роста АД и ИМЛЖ. Гистологически кардиопротективный эффект МБД проявляется отсутствием выраженных дистрофических изменений, снижением степени гипертрофии кардиомиоцитов, ядерно-цитоплазматического отношения и площади фиброза (диффузного и периваскулярного). Уменьшение выраженности гипертрофии миокарда, отмеченное у крыс с НЭ на МБД, может быть связано с замедлением роста уровня экспрессии гена NF-κB. Наши данные согласуются с результатами других исследований, выявившими ингибирование NF-κB в почках животных с ХБП при потреблении МБД с включением кетокислот [13]. Возможно также, что диеты, содержащие кетоаналоги незаменимых аминокислот, увеличивают экспрессию Kruppel-подобного фактора-15 (KLF-15), подавляющего развитие фиброза в миокарде крыс с НЭ [12].

Кардиопротективное действие МБД с включением 10% кетостерила, как показало наше ис-

следование, может быть обусловлено и влиянием на экспрессию некоторых микроРНК. Известно, что микроРНК играют важную роль в различных патофизиологических процессах, в том числе модулируют развитие фиброза в тканях. Имеются данные об участии микроРНК-21 в инициации и прогрессировании фиброза в почках. Ее уровень повышается в моче у пациентов с ХБП, а ингибирование микроРНК-21 приводит к сохранению структуры и функции почек. Не исключено, что в условиях экспериментальной дисфункции почек микроРНК-21 также принимает участие в формировании фиброза и ремоделировании миокарда, модулируя сигнальный путь TGF-β1/Smad [14].

Наше исследование также выявило повышение экспрессии микроРНК-203 и 133 в миокарде животных с НЭ. Однако у крыс, получавших МБД, рост относительного уровня экспрессии этих микроРНК проявлялся в большей степени, чем у животных на стандартном рационе. МикроРНК-203 обычно рассматривают в качестве супрессора многих видов злокачественных опухолей у людей. Однако о механизмах действия этой микроРНК в миокарде животных с НЭ можно только предполагать. В исследовании Q. He и соавт. (2017) показано, что избыточное содержание микроРНК-203 в культуре кардиомиоцитов мышей (*in vitro*) снижало экспрессию генов трансформирующего фактора роста-β1 (TGF-β1), фактора роста соединительной ткани и фибронектина (CTGF), принимающих участие в регуляции активности фибробластов миокарда в условиях хронической ишемии. Напротив, ингибирование экспрессии микроРНК-203 сопровождалось повышением уровней TGF-β1, CTGF и фибронектина, потенцируя развитие фиброза [15]. МикроРНК-203 может реализовать свое воздействие и за счет регуляции других генов, например, гена рецептора эндотелина типа А (активация этого типа рецепторов приводит к вазоконстрикции, клеточной пролиферации и гипертрофии стенки сосудов), гена фактора некроза опухоли (влияет на липидный метаболизм, функцию эндотелия), гена фактора роста соединительной ткани (участвует в ангиогенезе, адгезии и миграции макрофагов), ряда генов интерлейкинов, принимающих участие в процессах хронического воспаления. В отличие от микроРНК-203 микроРНК-133 специфически экспрессируется в сердце и выполняет регуляторную роль в эмбриональном развитии и ремоделировании миокарда. Полагают, что эта микроРНК обладает антиапоптотическим действием. Получены данные о кардиопротективной роли микроРНК-133

при остром инфаркте миокарда [16]. Однако об эффектах миРНК-133 в отношении миокарда при ХБП практически ничего неизвестно.

МБД с назначением кетоаналогов незаменимых аминокислот может оказывать кардиопротективный эффект и через непосредственное влияние на некоторые метаболические нарушения (метаболический ацидоз, нарушения фосфорно-кальциевого обмена) или благодаря снижению выработки побочных продуктов метаболизма белка. Поддержание нормального уровня сывороточного фосфора способствует снижению уровня паратиреоидного гормона в крови, участвующего в механизмах артериальной гипертензии, гипертрофии миокарда и кальцификации тканей [17]. Гиперфосфатемия является результатом положительного баланса фосфора и способствует увеличению продукции фактора роста фибробластов-23 (FGF-23). МБД снижает гиперфосфатемию и концентрацию FGF-23 в сыворотке крови [18]. Это особенно важно, так как концентрация FGF-23 является независимым предиктором негативных сердечно-сосудистых событий. В наших ранних экспериментах у крыс с НЭ на фоне МБД с включением препарата «Кетостерил», был отмечен более низкий уровень фосфора в сыворотке крови ($2,15 \pm 0,05$ ммоль/л), чем у животных на стандартной диете ($2,62 \pm 0,010$ ммоль/л, $p < 0,01$) [19]. Мы полагаем, что МБД, замедляя развитие нарушений фосфорно-кальциевого обмена, снижает выраженность гипертрофии миокарда при дисфункции почек.

Уменьшение потребления животного белка может оказывать кардиопротективное действие и в результате снижения концентрации уремических токсинов, таких как триметиламин – *N*-оксид (ТМАО) и *n*-крезилсульфат. Существующие данные свидетельствуют о том, что повышенные уровни ТМАО ускоряют прогрессирование ХБП за счет усиления фосфорилирования Smad3, регулятора фиброза посредством трансдукции TGF- β . Поэтому можно предположить, что тип белка может быть в некоторой мере более важным для прогрессирования заболевания почек и сердечно-сосудистых осложнений, чем общее количество потребляемого белка [20]. Сокращение потребления животного белка при МБД связано и со снижением поступления насыщенных жирных кислот, улучшением профиля липидов в сыворотке (снижение триглицеридов, увеличение соотношения Apo A1/Apo B) и, следовательно, уменьшением риска сердечно-сосудистых заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования позволяют полагать, что длительное использование МБД с применением кетоаналогов незаменимых аминокислот может оказывать потенциальный кардиопротективный эффект при ХБП, замедляя рост АД, увеличение массы миокарда ЛЖ и формирование структурных изменений в миокарде. Существенную роль в этом может играть снижение экспрессии NF- κ B и микроРНК-21, а также повышение экспрессии миРНК-203 и 133 в миокарде.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ REFERENCES

1. Sárközy M, Gáspár R, Zvara Á et al. Chronic kidney disease induces left ventricular overexpression of the pro-hypertrophic microRNA-212. *Sci Rep* 2019; 9(1):1302. doi: 10.1038/s41598-018-37690-5
2. Wang Y, Zhang T, Cao X et al. Prostaglandin E_2 induced cardiac hypertrophy through EP2 receptor-dependent activation of β -catenin in 5/6 nephrectomy rats. *ESC Heart Fail* 2021; 8(3):1979–1989. doi: 10.1002/ehf2.13269
3. Kaesler N, Babler A, Floege J, Kramann R. Cardiac remodeling in chronic kidney disease. *Toxins* 2020; 12: 161. doi: 10.3390/toxins12030161
4. Verzola D, Picciotto D, Saio M et al. Low protein diets and plant-based low protein diets: do they meet protein requirements of patients with chronic kidney disease? *Nutrients* 2021; 13: 83. <https://doi.org/10.3390/nu13010083>
5. Apetrii M, Timofte D, Voroneanu L, Covic A. Nutrition in chronic kidney disease—the role of proteins and specific diets. *Nutrients* 2021; 13: 956. <https://doi.org/10.3390/nu13030956>
6. Kalantar-Zadeh K, Joshi S, Schlueter R et al. Plant-dominant low-protein diet for conservative management of chronic kidney disease. *Nutrients* 2020; 12: 1931. doi:10.3390/nu12071931
7. Koppe L, Cassani de Oliveira M, Fouque D. Ketoacid analogues supplementation in chronic kidney disease and future perspectives. *Nutrients* 2019; 11: 2071. doi: 10.3390/nu11092071
8. Molina P, Gavela E, Vizcaino B et al. Optimizing diet to slow CKD progression. *J Front Med (Lausanne)* 2021; 8:654250. doi: 10.3389/fmed.2021.654250. eCollection 2021
9. Teixeira dos Santos AL, Duarte CK, Santos M et al. Low linolenic and linoleic acid consumption are associated with chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 2018; 13(8):e0195249. doi: 10.1371/journal.pone.0195249. eCollection 2018
10. Береснева ОН, Парастаева ММ, Иванова ГТ и др. Роль кетостерила в нефропротекции и кардиопротекции при экспериментальной уремии. *Нефрология* 2006; 10(1):56–61. doi:10.24884/1561-6274-2006-10-1-56-61
11. Beresneva ON, Parastaeva MM, Ivanova GT i dr. The role of ketosteril in nephroprotection and cardioprotection in experimental uremia. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2006; 10(1):56–61 (In Russ.). doi:10.24884/1561-6274-2006-10-1-56-61
12. Noels H, Lehrke M, Vanholder R, Jankowski J. Lipoproteins and fatty acids in chronic kidney disease: molecular and metabolic alterations. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17(8):528–542. doi: 10.1038/s41581-021-00423-5
13. Gao X, Huang L, Grosjean F et al. Low-protein diet supplemented with ketoacids reduces the severity of renal disease in 5/6 nephrectomized rats: a role for KLF15. *Kidney Int* 2011; 79:987–996. doi: 10.1038/ki.2010.539
14. Wang M, Xu H, Shin O et al. Compound α -keto acid tablet supplementation alleviates chronic kidney disease progression via inhibition of the NF- κ B and MAPK pathway. *J Transl Med* 2019; 17:122. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1856-9>.
15. Wang JY, Gao YB, Zhang N et al. MicroRNA-21 overexpression enhances TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy.

thy. *Mol Cell Endocrinol* 2014;392(1–2):163–172. doi:10.1016/j.mce.2014.05.018

15. He Q, Wang C, Qin J et al. Effect of miR-203 expression on myocardial fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21:837–842

16. Sun B, Liu S, Hao R et al. RGD-PEG-PLA delivers MiR133 to infarct lesions of acute myocardial infarction model rats for cardiac protection. *Pharmaceutics* 2020;12(6):575. doi: 10.3390/pharmaceutics12060575

17. Martinez-Arias L, Panizo-García S, Martin-Virgala J et al. Contribution of phosphorus and PTH to the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in an experimental model of chronic renal failure. *Nefrologia (Engl Ed)* 2021; S0211-6995(21)00033-3. doi:10.1016/j.nefro.2021.02

18. Di Iorio B, Di Micco L, Torraca S et al. Acute effects of very-low-protein diet on FGF 23 levels: a randomized study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7(4):581–587. doi: 10.2215/CJN.076.40711

19. Иванова ГТ, Кучер АГ, Береснева ОН и др. Оценка в эксперименте нефропротективного и кардиопротективного эффектов длительного применения малобелковой диеты, включающей кетостерил. *Нефрология* 2011. 15(4):45–50. doi: 10.24884/1561-6274-2011-15-4-45-50

Ivanova GT, Kucher AG, Beresneva ON i dr. Experimental evaluation of the nephroprotective and cardioprotective effects of long-term use of a low-protein diet including ketosteril. *Nephrology (Saint-Petersburg)* 2011;15(4):45–50 (In Russ.). doi: 10.24884/1561-6274-2011-15-4-45-50

20. Molina P, Gavela E, Vizcaíno B et al. Optimizing Diet to Slow CKD Progression. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8:654250. doi: 10.3389/fmed.2021.654250. eCollection

Сведения об авторах:

Береснева Ольга Николаевна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек, старший научный сотрудник. Тел.: (812) 346-39-26, E-mail beresnevaolga@list.ru. ORCID: 0000-0002-7532-2405

Парастаева Марина Магрезовна, канд. биол. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек, старший научный сотрудник. Тел.: (812) 346-39-26, E-mail: marina_parastaeva@list.ru. ORCID: 0000-0002-4526-8671

Иванова Галина Тажимовна, канд. биол. наук 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем, старший научный сотрудник. Тел.: 8 (812) 328-07-01, E-mail: tazhim@list.ru. ORCID: 0000-0003-0188-5173

Проф. Зарайский Михаил Игоревич, д-р мед. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, E-mail: mzaraiski@yandex.ru. ORCID:0000-0002-7605-4369

Доц. Орлова Светлана Александровна, канд. мед. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, кафедра

пропедевтики внутренних болезней с клиникой. Тел.: (812) 338-69-19, E-mail: orlova_s_2001@mail.ru; ORCID 0000-0003-0515-2575

Проф. Кучер Анатолий Григорьевич, д-р мед. наук 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, научно-исследовательский институт нефрологии, научно-клинический исследовательский центр, заместитель директора. Тел.: +7(921)421-18-17; e-mail: prof.kucher@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-5616-3488

About the authors:

Olga N. Beresneva, PhD

Affiliations: 197022, Russia, St-Petersburg, L.Tolstoy st., 17, build. 54. Pavlov University Institute of Nephrology Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney Senior researcher. Phone (812)346-39-26, E-mail: beresnevaolga@list.ru. ORCID: 0000-0002-7532-2405

Marina M. Parastaeva, PhD

Affiliations: 197022, Russia, St-Petersburg, L.Tolstoy st., 17, build. 54. Pavlov University Institute of Nephrology Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney Senior researcher. Phone (812)346-39-26, E-mail: marina_parastaeva@list.ru. ORCID:0000-0002-4526-8671

Galina T. Ivanova, PhD

Affiliations: 199034, Russia. St-Petersburg, Makarova Emb., 6, I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, laboratory of physiology of the cardiovascular and lymphatic systems. Senior researcher. Phone: 8 (812) 328-07-01, E-mail: ivanovagt@infran.ru. ORCID: 0000-0003-0188-5173

Prof. Mikhail I. Zarski, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: 197022, Russia, St-Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov University, Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine; E-mail: mzaraiski@yandex.ru. ORCID:0000-0002-7605-4369

Svetlana A. Orlova, MD, PhD.

Affiliations: 197022, Russia, St-Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build. 54. Pavlov University, Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Assistant prof. Phone: +78123386919, E-mail: orlova_s_2001@mail.ru; ORCID 0000-0003-0515-2575

Prof. Anatoly G. Kucher, MD, PhD, DMedSci

Affiliations: 197022, Russia, St-Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build 54. Pavlov University, Research Institute of Nephrology, Research and Clinical Research Center, Vice-Director. Phone: +7(921)421-18-17; e-mail: prof.kucher@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-5616-3488

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: all authors made an equivalent contribution to the preparation of the publication.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 24.06.2022;
одобрена после рецензирования 20.09.2022;
принята к публикации 01.11.2022
The article was submitted 24.06.2022;
approved after reviewing 20.09.2022;
accepted for publication 01.11.2022