

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Попова Анфиса Сергеевна**

РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ В УСЛОВИЯХ  
МИКРОГРАВИТАЦИИ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЕЕ ЭФФЕКТОВ У  
МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ

Специальность: 03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2018

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

<b>Научный руководитель:</b>	<i>Андреев-Андриевский Александр Александрович - кандидат биологических наук</i>
<b>Официальные оппоненты:</b>	<i>Буравкова Людмила Борисовна - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное Государственное бюджетное учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской Академии Наук, заведующая отделом «Молекулярно-клеточная биомедицина», заведующая лабораторией клеточной физиологии</i> <i>Лукошкова Елена Владимировна – доктор биологических наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр» Минздрава РФ, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии, лаборатория экспериментальной патологии сердца, ведущий научный сотрудник</i> <i>Медведев Олег Стефанович - доктор медицинских наук, профессор, МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, заведующий кафедрой фармакологии, заведующий научно-исследовательской лабораторией фармакологии сердечно-сосудистой системы</i>

Защита диссертации состоится «8» октября 2018 г. в 17 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 при биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1. Факс: (495)939-43-09.

E-mail: [bellaum@mail.ru](mailto:bellaum@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/137171938/>

Автореферат разослан «7» сентября 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Умарова Б.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность темы.* Гравитационный фактор играет большую роль в нормальном функционировании сердечно-сосудистой системы. Адаптивные изменения в кровообращении при длительном пребывании в условиях микрогравитации<sup>1</sup> затрагивают микроциркуляцию, водный обмен, работу сердца, его центральную регуляцию. При возвращении к условиям нормальной гравитации данные изменения ограничивают работоспособность человека, что обуславливает научную и практическую значимость исследования механизмов адаптации сердечно-сосудистой системы млекопитающих к микрогравитации ( $\mu\text{G}$ ).

Работа сердечно-сосудистой системы, как одной из ключевых систем в обеспечении функционирования всего организма, привлекает внимание исследователей с первых этапов развития космонавтики. В условиях  $\mu\text{G}$  исчезает вес крови, и она перемещается практически только за счет работы сердца. Исчезновение гидростатического градиента ведет к тому, что артериальное давление становится практически одинаковым в разных точках сосудистого русла – в среднем 100 мм рт. ст., наблюдается перемещение жидких сред организма в краниальном направлении [Hargens и др., 1992; Norsk и др., 2015]. Эти изменения отмечаются у космонавтов невооруженным глазом и получили в англоязычной литературе характерные названия («moon face» – одутловатое лицо, «bird legs» – уменьшение объема голеней). Считается, что перераспределение крови является триггером, инициирующим ряд адаптивных изменений в центральной и периферической гемодинамике [Arbeille и др., 2001], в работе сердца и центральной регуляции кровообращения [Baevsky и др., 2007; Fritsch и др., 1992; Morita, Abe, Tanaka, 2016], происходит морфофункциональная перестройка сосудов различных бассейнов [Behnke и др., 2013; Sofronova и др., 2015; Taylor и др., 2013]. Кроме того, во время полета и, особенно, после возвращения на Землю снижается устойчивость сердечно-сосудистой системы к функциональным нагрузкам: физическим упражнениям, изменению положения тела, приложению отрицательного давления к нижней половине тела [Convertino, 1996; Lee и др., 2015].

Современные представления о влиянии космической среды на организм человека в значительной степени базируются на результатах экспериментальных исследований на животных. Серия биоспутников «Космос» с различными млекопитающими на борту (собаки, обезьяны, крысы) позволила провести обширные исследования сердечно-сосудистой, опорно-двигательной, эндокринной, сенсорных систем, систем кроветворения и многих других [Григорьев, Ильин, 2007]. Научные результаты этой программы стали основой для разработки современных систем профилактики, что позволило космонавтам осуществлять полугодовые и даже годовые полеты на орбите. Программа биоспутников была возобновлена в 2013 г.: на автоматическом биоспутнике «БИОН-М №1» самцы мышей C57BL/6 в течение 30 суток находились на орбите. Целью научной программы экспериментов на мышах было исследование системных, клеточных и молекулярных механизмов адаптации основных физиологических систем к микрогравитации, а также реадаптации к условиям гравитационного поля Земли после возвращения животных [Андреев-Андриевский и др., 2014].

Реальные космические полеты дают уникальные, но немногочисленные результаты, что определяет необходимость проведения наземных модельных экспериментов: антиортостатическая гипокinezия, иммерсия, параболический полет. В этих моделях воспроизводятся некоторые эффекты микрогравитации, которые позволяют, в том числе,

---

<sup>1</sup> Микрогравитация ( $\mu\text{G}$ ) – состояние практически полной невесомости, которое наблюдается в космических кораблях на орбите Земли. При этом, однако, сохраняется действие гравитационного поля, но оно ничтожно мало за счет движения по орбите с первой космической скоростью (7.9 км/с).

изучить последствия перераспределения жидкости в организме. Исследования на людях имеют ряд ограничений, наиболее существенным из которых является невозможность применения ряда инвазивных методов исследования. Велико значение мер профилактики, смягчающих негативное влияние космического полета на физиологические системы космонавта, но при этом маскируются эффекты пребывания в полете. В этой связи очевидна актуальность экспериментов на животных, позволяющих применять более широкий спектр методов исследования и стандартизировать условия эксперимента. Особого внимания заслуживают мелкие лабораторные животные – мыши и крысы, на которых отработаны стандартные методические приемы создания антиортостатической гипокинезии [Ильин, Новиков, 1980; Morey-Holton, Globus, 2002], широко используемые для исследования костно-мышечного аппарата, эндокринной системы, сосудов и, в целом, гемодинамики.

Число работ, в которых объектом исследования сердечно-сосудистой системы в условиях реальной или моделируемой микрогравитации является мышшь, весьма ограничено. Использование мышшей дает большие возможности исследования регуляторных механизмов в связи с доступностью генетически-модифицированных животных и хорошей разработанностью молекулярно-генетических методов. Но, возможно, не менее интересным является вопрос о реакции сердечно-сосудистой системы мышшей (в частности, перераспределения жидкости) на условия реальной и моделируемой микрогравитации по сравнению с более крупными млекопитающими, т.е. о зависимости эффекта от размера тела. Поэтому исследование гемодинамических реакций мышшей, которые  $\approx$  в 3000 раз меньше человека, является интересным в сравнительно-физиологическом аспекте и перспективным с точки зрения возможности выявления не зависящих от размера тела механизмов адаптации сердечно-сосудистой системы к микрогравитации.

**Цель исследования:** проанализировать параметры системной гемодинамики у мышшей (АД и ЧСС) в условиях космического полета и при двигательной активности на Земле, а также изучить некоторые механизмы адаптации/реакции сердечно-сосудистой системы млекопитающих на изменения гравитационной среды в зависимости от размеров тела.

**Задачи исследования:**

1. Оценить влияние имплантируемых телеметрических датчиков давления на функциональные показатели мышшей и их двигательную активность.
2. Разработать метод оценки гемодинамических показателей мышшей при физической нагрузке.
3. Проанализировать гемодинамические параметры мышшей в 30-суточном космическом полете на борту биоспутника «БИОН-М № 1» и в период послеполетного восстановления в сравнении с животными, содержащимися на Земле с имитацией условий среды обитания на биоспутнике и в стандартных условиях вивария.
4. Изучить гемодинамические реакции мышшей на стартовый профиль перегрузок, воспроизведенный при помощи центрифуги и исследовать гемодинамические реакции мышшей при изменении транслегочного давления.
5. Проанализировать изменение объема крови, гематологических параметров, содержание воды в тканях мышшей в модели антиортостатического вывешивания.
6. Оценить реакции жидкостных объемов и гематологических показателей в модели антиортостатического вывешивания в зависимости от размера тела.

**Научная новизна.** В ходе диссертационного исследования проведена подробная оценка влияния имплантируемых телеметрических датчиков на функциональное состояние и двигательную активность мышей. Было показано, что вживление телеметрических датчиков практически не оказывает влияния на результаты функциональных тестов, что обосновывает применение метода телеметрической регистрации артериального давления у мышей в комплексных исследованиях, включающих одновременную регистрацию поведенческих и функциональных показателей животных.

По результатам фармакологического анализа реакции сердечно-сосудистой системы мышей при беге на тредбане (беговой дорожке) установлено, что этот классический метод мало применим для оценки гемодинамической стоимости бега у мышей, ввиду высокой стресс-реактивности этих грызунов. Для оценки реакций частоты сердечных сокращений (ЧСС) на физическую нагрузку разработан новый метод, основанный на анализе гемодинамических показателей при произвольном беге в колесе.

В работе представлены результаты анализа проведенной впервые непрерывной регистрации артериального давления (АД) и ЧСС мышей в ходе 30-суточного космического полета, а также в ходе послеполетного восстановления, включая оценку гемодинамического обеспечения двигательной активности животных. Была обнаружена полетная и стойкая послеполетная тахикардия, а также повышение гемодинамической стоимости бега. Обнаруженные у мышей изменения сходны с реакциями более крупных животных и человека, несмотря на огромные различия в размере тела, и соответственно, в величине гидростатического градиента давления, что подчеркивает важность механизмов адаптации сердечно-сосудистой системы к  $\mu\text{G}$ , мало зависящих от размера тела.

В диссертационной работе были впервые исследованы гемодинамические реакции мышей на осевые перегрузки и изменение транслегочного давления. В условиях моделирования эффектов микрогравитации была впервые проведена оценка динамики адаптивного изменения объемов крови и плазмы у мышей. Исследование изменения жидкостных объемов тела при перераспределении жидкости в модели вывешивания показало, что количество эритроцитов уменьшается независимо от размера, объем крови не меняется при вывешивании, а увеличение объема интерстициальной жидкости более выражено у животных большего размера.

**Теоретическая и практическая значимость.** Показана принципиальная возможность и информативность применения телеметрической регистрации физиологических показателей, в частности, артериального давления у мышей: в нагрузочных тестах, в космическом полете, при центрифугировании. Разработан информативный метод оценки гемодинамической стоимости двигательной активности у мышей в нестрессирующих условиях домашней клетки.

Анализ гемодинамики мышей во время и после полета выявил сходство между мелкими четвероногими мышами и человеком, а именно: тахикардию, сохраняющуюся в период реадаптации на Земле, снижение гемодинамического обеспечения двигательной активности, более выраженную реакцию на гравитационный стресс при посадке. По-видимому, в реакцию адаптации сердечно-сосудистой системы вносит существенный вклад не только отсутствие гидростатического градиента, но и мало зависящие от размера факторы, например: изменения на микроциркуляторном уровне.

С использованием трех видов лабораторных животных: мышей, крыс и кроликов - исследована аллометрическая зависимость реакции жидкостных объемов и гематологических показателей при моделируемой микрогравитации. В этой части работы был впервые применен фармакокинетический метод оценки жидкостных объемов у вывешенных животных. Показано,

что только реакция объема межклеточной жидкости на моделируемую микрогравитацию зависит от размера тела, в то время как число эритроцитов изменяется у животных с разной массой сходным образом, что указывает на существование физиологических механизмов адаптации с различной зависимостью от размера тела.

Данные диссертационной работы вносят вклад в общую картину адаптационных процессов в сердечно-сосудистой системе млекопитающих при измененном уровне гравитации.

#### ***Основные положения, выносимые на защиту.***

1. Вживление телеметрических датчиков не искажает результаты поведенческих и нагрузочных тестов с мышами и позволяет проводить комплексные эксперименты с одновременной регистрацией гемодинамических и поведенческих показателей. Для оценки гемодинамической стоимости бега целесообразно проводить мониторинг двигательной активности в условиях домашней клетки, ввиду высокой стресс-реактивности мышей.
2. Адаптация сердечно-сосудистой системы мышей к микрогравитации сходна с реакциями более крупных животных и человека, несмотря на различия в размере тела и величине гидростатического градиента давления и обусловлена мало зависимыми от размера тела механизмами.
3. Гемодинамические реакции мышей на перегрузку, по-видимому, обуславливаются видоспецифичными вестибуло-кардиальными взаимодействиями, а не реакциями на кровенаполнение сосудов малого круга или на перераспределение крови в грудной клетке.
4. При моделировании эффектов микрогравитации количество эритроцитов уменьшается независимо от размера тела, объем крови не меняется, а изменение объема интерстициальной жидкости более выражено у животных большего размера. Таким образом, снижение параметров красной крови при действии микрогравитации, по крайней мере в модельных условиях, не связано непосредственно с перераспределением жидкости и может быть одной из причин адаптации сердечно-сосудистой системы к микрогравитации в условиях космического полета.

***Апробация результатов.*** Результаты диссертационной работы были доложены на VII Всероссийской школе-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности с международным участием (Москва, 2013), на XV Конференции по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием (Москва, 2014), на XIII Конференции молодых ученых, специалистов и студентов ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Москва, 2014), на XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, 2015), на XIV Конференции молодых ученых, специалистов и студентов ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Москва, 2015), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 2016), на Международной конференции "Пилотируемое освоение космоса" (Королев, 2016), на XVI Конференции по космической биологии и медицине (Москва, 2016), на XVI Конференции молодых ученых, специалистов и студентов ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Москва, 2017), на XXXVIII Ежегодном съезде Международного Общества гравитационной физиологии (Звенигород, Россия, 2017).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносов 22 мая 2018 года.

***Публикации.*** По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ: 8 статей в периодических изданиях, индексируемые аналитическими базами Scopus, WoS, RSCI и

соответствующих перечню ВАК, 10 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских научных конференций.

**Личный вклад автора.** Автор принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, хирургической подготовке животных, проведении поведенческих и физиологических экспериментов; анализе, статистической обработке и обобщении результатов; подготовке статей и тезисов; представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, заключение, список цитируемой литературы. Работа изложена на 185 страницах, иллюстрирована 37 рисунками и 15 таблицами; список литературы включает 426 источников.

### **Материалы и методы исследования**

**Общий обзор и схема экспериментов.** Работа включала три этапа: 1) оценку применимости и ограничений метода телеметрической регистрации гемодинамических параметров у мышей, 2) регистрацию и анализ параметров системной гемодинамики у мышей в космическом полете на борту биоспутника «БИОН-М № 1» и в наземном контрольном эксперименте, 3) модельные эксперименты, направленные на анализ гемодинамических реакций, зарегистрированных в космическом эксперименте.

Первый этап (подготовительный) включал 2 эксперимента. *Эксперимент 1.1* был проведен для оценки влияния имплантации телеметрических датчиков давления на функциональные показатели мышей и их двигательную активность. Были использованы 24 самца мышей C57BL/6 с вживленными датчиками («ОПЕР») и 42 неоперированные особи («ИНТ»). Оценивали динамику восстановления животных после операции, через 3 и 8 нед. после вживления датчиков, что соответствовало предполагаемым срокам обследования животных в космическом эксперименте: их поведение в тесте «открытое поле», силу хвата, координацию на ротароде, а также проводили 7-суточный мониторинг двигательной активности в беговом колесе с использованием автоматизированной системы сбора физиологических данных Феномастер (TSE Instruments, Германия).

В *эксперименте 1.2* был разработан и обоснован информативный метод оценки гемодинамических показателей мышей при физической нагрузке в нестрессирующих условиях. В эксперименте было использовано две группы самцов мышей C57BL/6 с вживленными датчиками артериального давления (ДА). У животных первой группы (n=9) регистрировали артериальное давление и ЧСС при: 1) повторяющемся взятии в руки; 2) при ходьбе в «открытом поле»; 3) при беге на тредбане (6, 12 и 18 м/мин). Для оценки вегетативной регуляции работы сердечно-сосудистой системы в этих условиях применяли: адrenoблокатор (атенолол, 2 мг/кг), холинолитик (ипратропий, 2 мг/кг), их комбинацию, а для оценки вклада стресс-реакции – анксиолитик (диазепам, 5 мг/кг), в контрольных тестированиях вводили физиологический раствор («ФР», 0.9% NaCl). Тестирования на фоне этих 5 воздействий проводили в рандомизированном порядке с интервалами 2-3 дня. Фармакологические воздействия в последующих экспериментах проводили так же. У самцов второй группы мышей (N=8) регистрировали гемодинамические показатели при произвольной двигательной активности в беговом колесе, расположенном в домашней клетке.

На втором этапе (*эксперимент 2*) была впервые проведена непрерывная регистрация гемодинамических показателей мышей на всех стадиях космического полета на борту биоспутника «БИОН-М №1» и в течение послеполетного восстановления. Самцы мышей

C57BL/6 были разделены на три экспериментальные группы: 1) полетную (n=5, «КП»), 2) наземную контрольную (n=5, «НК»), животные которой содержались в полетном оборудовании с воспроизведением условий обитания на биоспутнике, и 3) виварный контроль (n=6, «ВК») – содержание в стандартных условиях вивария. Мониторинг АД и ЧСС мышей вели в предполетный период, на протяжении 30-сут. космического полета, а также в течение 7-сут. после полета. В пред- и послеполетный период была проведена оценка гемодинамической стоимости бега. Неисправности полетного оборудования привели к гибели части животных, поэтому данные были получены: от 5 особей полетной группы в предполетный период, от 4 особей – во время полета (на большей его продолжительности), однако, в послеполетный период могли быть исследованы только две мыши, из них в беговом колесе – одна.

Третий этап включал 5 экспериментов. *Эксперимент 3.1* был проведен с целью анализа гемодинамических реакций мышей на стартовый профиль перегрузок, воспроизведенный при помощи центрифуги радиусом 2 м. Мышей (C57BL/6, n=9) подвергали воздействию центрифугирования на фоне введения: а) симпатолитика, б) холинолитика, в) сочетанного введения блокаторов, г) после введения анксиолитика диазепама, или д) в контрольных опытах мышам вводили физиологический раствор. Тестирования проводили повторно в рандомизированном порядке с интервалом 3 дня. Гемодинамические показатели животных и уровень перегрузок регистрировали в течение 15 мин до, во время ( $\approx 10$  мин) и в течение 45 мин после окончания воздействия перегрузок.

В *эксперименте 3.2* были проанализированы гемодинамические реакции мышей при изменении формы грудной клетки и модуляции транслегочного давления. Наркотизированных уретаном мышей (C57BL/6, n=15) помещали в барокамеру и изменяли давление в барокамере ( $\pm 10$  мм. рт. ст.), повышая и понижая транслегочное давление. При этом животные дышали атмосферным воздухом через трахеостому - У животных одновременно регистрировали: электрокардиограмму, артериальное, центральное венозное, правожелудочковое давление, давление в брюшной и грудной (эзофагальное) полости.

В *эксперименте 3.3* у наркотизированных уретаном мышей (CD-1, n=15) прямым способом регистрировали правожелудочковое давление при «тилт-тесте» - переходе положения тела мыши с горизонтального на антиортостатическое ( $-30^\circ$ ), моделируя перераспределение жидкости в краниальном направлении.

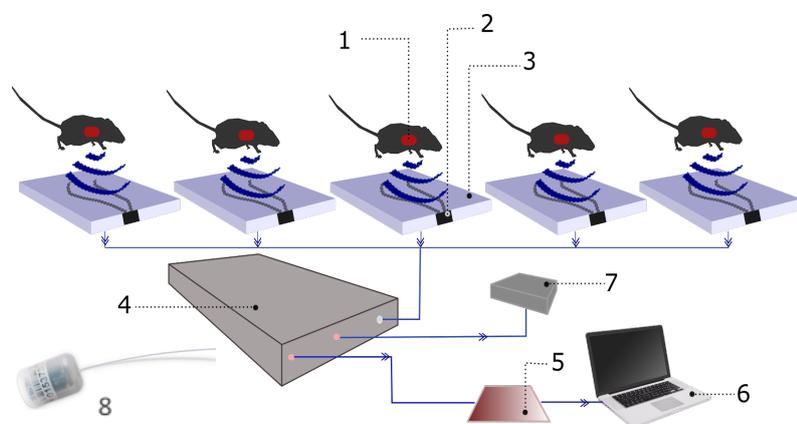
В *эксперименте 3.4* оценивали: объем крови, гематологические показатели и содержание воды в тканях мышей при моделировании воздействия микрогравитации – в модели антиортостатического вывешивания. Самцов мышей BALB/C подвергали вывешиванию на срок 0 (прикрепленные), 0,5, 1, 2, 3 или 7 сут. (n=75), после чего определяли гематологические показатели и оценивали объем крови по разведению синего Эванса. Другую группу мышей (n=75), «вывешенных» на такие же сроки, использовали для измерения содержания воды в тканях по разности их влажной и сухой массы.

В *эксперименте 3.5* исследовали зависимость реакции жидкостных объемов и гематологических показателей на антиортостатическое вывешивание от размера тела. Динамику гематологических показателей анализировали у мышей BALB/c (n=8), крыс Wistar (n=11) и новозеландских белых кроликов (n=5) в течение 7 сут. вывешивания. Другие две группы животных либо подвергали вывешиванию (HLU), либо, в качестве контроля, прикреплению без разгрузки (АТТ). На 3-тй сут. воздействия определяли объем крови и межклеточной жидкости по объемам распределения меченых флуоресцеином (FITC) декстрана (M=150 кДа) и инулина (M=4 кДа), соответственно. Объемы распределения рассчитывали на основании фармакокинетических кривых меток в крови после однократного

внутривенного введения. В этой части эксперимента было использовано: 46 мышей BALB/c, 36 крыс Wistar, 20 кроликов.

**Животные.** Работа выполнена на 342 мышах, 47 крысах (питомники «Пушино», «Столбовая») и 25 кроликах (питомник «КролИнфо»). Протоколы экспериментов были одобрены Комиссиями по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова и ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

*Телеметрическую регистрацию артериального давления* осуществляли при помощи установки МТВ (Mouse telemetry on Bion), представляющей собой адаптированную к использованию на борту космического аппарата версию телеметрической системы производства DSI, США. Система МТВ была разработана специалистами CNES (Ж.-К. Лоре) в сотрудничестве с инженерами СКТБ Биофизприбор (под руководством А.О. Белгородского) и ГНЦ РФ – ИМБП РАН (А.И. Пахомов). Схема устройства системы МТВ показана на рис. 1; антенны для приема сигнала были вмонтированы в стенки капсул для содержания мышей (в «полетной» конфигурации) или дно arenas/клетки/клетки системы Phenomaster/в стенки тредбана (в «наземной» конфигурации).



**Рисунок 1.** Схема установки МТВ для телеметрической регистрации артериального давления.

1 - мышь с датчиком; 2 - антенна; 3 - приемник телеметрического сигнала; 4 - блок управления, принимающий сигнал по 5 каналам; 5 – адаптер; 6 - компьютер; 7 - регистратор для непрерывной автономной записи данных; 8 - датчик РА-С10.

Данные, извлеченные из регистратора, расшифровывали, после чего анализировали поударно с использованием программного обеспечения, разработанного в среде программирования Matlab (Mathworks, США) в.н.с. ГНЦ РФ – ИМБП РАН, к.ф.м.н. Боровиком А.С. В ходе анализа выделяли: отдельные сердечные циклы и рассчитывали длительность и среднее давление для каждого цикла; длительности пульсовых интервалов преобразовывали в частоту сердечных сокращений. Затем осуществляли синхронизацию записей с внешними данными. При необходимости детального анализа гемодинамических реакций использовали поударные величины АД и ЧСС или усредняли данные поминутно. Обработанные данные использовали для проведения последующих расчетов: оценки динамики АД и ЧСС за время полета, при запуске и спуске аппарата, реакции на кормление, суточной динамики этих величин. Аппаратные ограничения телеметрической системы (частота оцифровки  $\approx 500$  Гц) ограничивали точность измерения давления величиной  $\pm 0.7$  мм рт. ст., ЧСС – 12-15 уд/мин.

Для регистрации АД использовали миниатюрные датчики РА-10 (DSI, США) массой 1.4 г, корпус которых сделан из биосовместимого пластика (рис. 1). Катетер датчика заполнен несжимаемым гелем, обеспечивающим эффективную передачу давления на датчик в физиологическом диапазоне частот. Датчики вживляли под общей анестезией (тилетамин/золазепам + ксилазин) в сонную артерию, кончик катетера находился в дуге аорты. Корпус располагали подкожно на спине. Более подробно устройство и принцип работы телеметрической системы описаны в работах Kramer et al. 2003, Andreev-Andrievskiy et al, 2017.

*Тестирование двигательной активности и гемодинамики в нагрузочных тестах.*

**а)** Тест «Открытое поле» (ОП) - проводили с использованием круглой арены диаметром 63 см. После предварительной адаптации в комнате в течение 45 мин животное помещали в центр арены и в течение 20 мин вели видеозапись (20 кадров/с) поведения мыши: 10 мин свет (300 лк) + 10 мин темнота (инфракрасный свет). Анализ параметров двигательной активности (длина пути, время движения и др.) и ее распределение по центральной и периферической зонам арены осуществлялся автоматически, с использованием встроенных в программу EthoVision (Noldus, Нидерланды) алгоритмов анализа видео, стойки и груминг регистрировал оператор.

Для соотнесения ЧСС с показателями двигательной активности мышей в эксперименте 1.2 выделяли эпизоды непрерывного движения длительностью не менее 2 с и рассчитывали для них среднюю скорость. Эпизоды движения группировали по скорости, интервал группировки – 2 м/мин. После синхронизации данных рассчитывали средние значения АД и ЧСС для каждого эпизода движения, а затем средневзвешенные значения АД и ЧСС для интервала группировки. Для каждой мыши строили зависимость ЧСС от скорости движения.

**б)** Тестирование на беговой дорожке (тредбан) было использовано как классический способ получения градуированной физической нагрузки. После адаптации к тредбану (Colubmus Instruments, США) по 15 мин в день в течение 3 сут., мыши выполняли интервальный бег на фоне введения описанных ранее блокаторов. Интервалы между сессиями с применением блокаторов составляли 3-4 сут. для минимизации возможных эффектов тренировки и полного выведения предыдущего блокатора. Беговая сессия состояла из 4-5 подходов, каждый подход представлял собой последовательность 90 с интервалов со скоростью движения дорожки 6, 12, и 18 м/мин. Подходы были разделены промежутками по 90 с со скоростью движения 2 м/мин (рис. 1). Для расчета зависимости ЧСС от скорости бега усредняли ЧСС за последние 30 с бегового интервала, эти величины усредняли по циклам, затем – между мышами.

**в)** Регистрацию мышечной силы (силы хвата) осуществляли при помощи датчика FT03 (Grass instruments, США), сигнал усиливали и преобразовывали в цифровой с частотой 1 кГц (E14-140, L-Card, Россия), регистрировали и анализировали при помощи программного обеспечения PowerGraph (ДИ Софт, Россия). Предоставляли по 5 попыток для передних и задних лап, результаты которых усредняли.

**г)** Ротарод (вращающийся стержень) использовали для оценки координации движений животных. Мышей помещали на стержень (UgoBasil, Италия), скорость вращения которого равномерно увеличивали с 5 до 30 об/мин за 3 мин, регистрировали время удержания. Каждому животному предоставляли 5 попыток, результаты которых усредняли.

**д)** Произвольную двигательную активность животных оценивали по объему и скорости бега в колесе, установленном в домашних клетках системы автоматического сбора данных «Феномастер». Клетки оборудованы: весами для кормушки, поилкой, укрытием для мыши, датчиками движения, беговым колесом со счетчиком оборотов. Информация с датчиков непрерывно поступает на центральный компьютер [Robinson, Riedel, 2012].

Работа была выполнена на установке из 16 клеток (10 интактных мышей, 5 – с датчиком, 1 клетка для контроля фона). В каждой клетке находилось по одному животному, мониторинг поведения вели непрерывно в течение 6 сут.; у мышей с вживленным датчиком одновременно регистрировали артериальное давление. Мыши имели неограниченный доступ к легко подвижному колесу. Количество оборотов колеса и скорость вращения регистрировали с частотой 1 значение/с. Для телеметрической регистрации АД антенна приемника сигнала была

расположена непосредственно вокруг колеса. АД и ЧСС регистрировали непрерывно и синхронизировали с данными о двигательной активности в колесе с точностью не ниже 1 с.

При анализе данных об АД и ЧСС мышей при беге в колесе выделяли эпизоды бега длительностью не менее 2 с, для которых рассчитывали средние: скорость бега, АД и ЧСС. Отдельные эпизоды бега группировали по скорости (ширина интервала группировки – 2 м/мин) и рассчитывали индивидуальную зависимость ЧСС от скорости бега. Затем усредняли данные по дням и анализировали изменение скорости бега в течение эксперимента. Статистическую обработку зависимости ЧСС от скорости движения проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа при помощи программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.0, GraphPad Software, США).

Для *фармакологического анализа* вклада симпатического и парасимпатического компонентов в регуляцию ЧСС у мышей в нагрузочных тестах (ОП, бег на тредбане, центрифугирование) использовали блокатор  $\beta$ 1-адренорецепторов атенолол (2 мг/кг, А), блокатор М–холинорецепторов ипратропия бромид (2 мг/кг, И), а для снижения тревожности в условиях тестов – положительный аллостерический модулятор ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов диазепам (5 мг/кг, Д). Вещества вводили внутривенно в виде водных растворов (10 мл/кг). Дозы веществ были выбраны на основе анализа литературных данных и проверены в серии предварительных экспериментов (данные не приведены, см. Andreev-Andrievskiy и др., 2013).

*Центрифугирование* проводили для моделирования воздействия на мышей линейных перегрузок при запуске космического аппарата. Использовали центрифугу радиусом 2 м (экспериментальная платформа PLEXAN Университета г. Сан-Этьен, Франция). Эксперимент проводился совместно с специалистами Французского Космического Агентства. Воспроизводили профиль перегрузок при запуске ракеты-носителя «Союз»: три последовательных пика ускорения величиной 2, 3 и 5G в течение 10 мин. Центрифуга была оборудована видеосистемой для контроля состояния мышей и акселерометром.

*Воздействие на гемодинамику в грудной клетке.* Для оценки «механического» вклада действия перегрузок (вследствие увеличения веса тканей) в реакции ЧСС и САД при центрифугировании, в эксперименте на наркотизированных мышах регистрировали гемодинамические реакции в компрессионной камере при изменении транслегочного давления. Мышей помещали в герметичную камеру (изготовлена инженером ГНЦ РФ - ИМБП РАН Фадиным В.Г.) в которой при помощи насоса разрежали либо нагнетали ( $\pm 10$  мм рт. ст.) воздух. Мышь дышала атмосферным воздухом через трахеостому, выведенную наружу камеры. Артериальное, венозное и правожелудочковое давление регистрировали катетерами, давление в брюшной полости и внутрипищеводное давление – при помощи латексных микробалончиков, ЭКГ – игольчатыми электродами с использованием аппаратно-программного комплекса «PowerLab» (ADInstruments, Австралия).

*Реакция гемодинамики на антиортостатический поворот тела («тилт-тест»).* У наркотизированных мышей измеряли давление в правом желудочке при изменении положения тела относительно гипотетической гидростатической индифферентной точки (ГИТ). Мышь располагали на поверхности столика с шарнирным креплением, так чтобы ось шарнира совпадала с устьем нижней полой вены. Вели непрерывную регистрацию правожелудочкового давления, артериального давления и ЭКГ. Пассивную антиортостатическую ( $-30^\circ$ ) пробу длительностью 1 мин повторяли 5-7 раз с интервалом  $\approx 5$  мин. Правожелудочковое давление регистрировали и анализировали при помощи установки «PowerLab» и программного обеспечения «LabChart» (ADInstruments, Австралия).

*Антиортостатическое вывешивание.* Общепринятой моделью, воспроизводящей влияние микрогравитации на многие системы организма, является вывешивание за хвост [Ильин, Новиков, 1980; Morey-Holton и др., 2001; Ferreira и др., 2010]. За 2 суток до начала вывешивания мышам под изофлурановым ингаляционным наркозом с соблюдением асептической техники имплантировали кольцо из медицинской стальной проволоки (0.5 мм) между 3 и 4 хвостовыми позвонками. Затем мышей размещали в клетках для вывешивания, прикрепляли к шарнирному карабину, переходящему в нерастяжимую цепочку, свободно двигающуюся по поперечной перекладине клетки, таким образом максимально сохраняя подвижность животного. Мыши имели неограниченный доступ к воде и корму, а также гнездовой материал. После адаптации в течение 2 сут. мышей перевешивали выше таким образом, чтобы задние лапы были разгружены и ось тела с плоскостью пола составляла 30-40°. Мышей контрольной группы оставляли прикрепленными. Мышей ежедневно взвешивали с сохранением антиортостатического положения, следили за потреблением корма и воды.

*Анализ гематологических показателей.* Гематологические показатели крови (RBC, HCT, HGB, MCH, MCV, RDW-SD) определяли при помощи автоматического ветеринарного анализатора «Гемалйт-1280» («Диксион», Россия). Гематокрит в экспериментах 3.4 и 3.5 определяли при помощи центрифуги «Elmi-70» (Латвия).

*Содержание воды в тканях.* По окончании срока вывешивания мышей подвергали эвтаназии, обескровливали и извлекали головной мозг, почки, легкие, слюнные железы, семенные пузырьки, *m. triceps*, *m. soleus* и *m. gastrocnemius* из обеих конечностей. Образцы немедленно помещали в пробирки, герметизировали и сохраняли при -18...-20°C. Содержание воды в тканях рассчитывали по разности влажной и сухой (сушка 8 ч при 105°C) массы тканей, измеренной с точностью  $\pm 0.01$  мг при помощи весов «Discovery DV215CD» (Ohaus, США).

*Оценка объема крови по разведению синего Эванса.* Для оценки объема циркулирующей крови у вывешенных мышей был применен широко используемый метод – по разведению красителя, синего Эванса. Под изофлурановым наркозом мышам через катетер яремной вены вводили 100 мкл/кг 2% раствора синего Эванса при помощи микрошприца (Hamilton, Швейцария); раствор красителя вымещали из катетера 10-тью мкл физиологического раствора (0.9% NaCl). Через 3 мин после введения красителя («время смешивания») проводили торакотомию, забирали кровь из сердца и стабилизировали ее гепарином (200 ед/мл).

Для определения концентрации красителя сначала получали плазму крови (центрифугирование при 2000 g в течение 5 мин), осаждали из нее белки смешиванием с 50% трихлоруксусной кислотой (в объемном соотношении 2:1) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Супернатант разбавляли 96%-ным этанолом в соотношении 9:1, определяли концентрацию синьки на спектрофотометре «Plate Screen» («Хоспитекс», Италия) при длине волны 492 нм. Концентрацию красителя в крови рассчитывали по калибровочным кривым, приготовленным с использованием крови животных-доноров после идентичной пробоподготовки.

*Оценка объема крови и межклеточного объема фармакокинетическим методом, с использованием флуоресцентных полисахаридных меток.* Объем крови и межклеточной жидкости рассчитывали по объему распределения меченых FITC (TdV, Швеция) декстрана (M=150 кДа) и инулина (M=4 кДа), соответственно, после однократного внутривенного введения. Эксперимент был выполнен на мышах, крысах и кроликах, что позволило оценить зависимость реакции исследуемых показателей на моделируемую микрогравитацию от

размера организма. Измерение жидкостных объемов проводили через 3 сут. вывешивания; такой срок выбрали на основе результатов предыдущих экспериментов.

Перед измерением мышам и крысам вживляли катетер в яремную вену, кроликам – в краевую вену уха для отбора крови. Метки вводили в боковую вену хвоста (мыши, крысы) либо в боковую вену противоположного уха (кролики). Для определения объема крови животным с сохранением антиортостатического положения вводили 2 мг/кг FITC-декстрана (1 мл/кг) и отбирали кровь через 1, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 и 360 мин после введения метки. Для определения объема межклеточной жидкости животным вводили 10 мг/кг FITC-инулина, пробы отбирали через 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60 и 120 мин после введения метки. Объем проб крови составлял 10, 50 и 100 мкл для мышей, крыс и кроликов соответственно, был минимально достаточен для проведения анализа, а суммарный отбираемый объем крови не превышал 5% от общего объема крови. Растворы полисахаридов перед использованием очищали от свободной метки длительным диализом против 1 л ФР в ячейках EasyDial (Orange Scientific, Бельгия) с размером пор 1 кДа. В полученной из крови плазме (2000 г в течение 10 мин) стабилизировали метку НЕРЕС'ом (100 мМ), замораживали и сохраняли при -18...-22°C до анализа. Анализ проводили на микропланшетном флуориметре Anthos Zenith 3100 в черных 284-луночных планшетах. Концентрацию красителя в крови рассчитывали по калибровочным кривым, приготовленным с использованием крови животных-доноров после идентичной пробоподготовки.

Анализ фармакокинетических кривых и объема распределения проводили в рамках одночастевой (FITC-декстран, уравнения 1-2) и двухчастевой моделей (FITC-инулин, уравнения 3-8, С-концентрация вещества в крови, А, В – комплексные коэффициенты фармакокинетических уравнений,  $k_{21}$ ,  $k_{12}$ , – константы, характеризующие скорость распределения между компартментами (объемами),  $k_{el}$  – константа элиминации). Аллометрические зависимости исследуемых показателей рассчитывали согласно уравнению 9 (М–масса тела, N–показатель степени,  $Y_0$  – пересечение с осью ординат, величина показателя при нулевой массе тела).

$$C = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} \quad (1); \quad V = \frac{\text{доза}}{A} \quad (2); \quad C = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (3); \quad V_1 = \frac{\text{доза}}{A+B} \quad (4); \quad k_{21} = \frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{A+B} \quad (5);$$
$$k_{el} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}} \quad (6); \quad k_{12} = \alpha + \beta - k_{el} - k_{21} \quad (7); \quad V_{ss} = \frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} \cdot V_1 \quad (8); \quad Y = Y_0 \cdot M^N \quad (9).$$

*Статистический анализ данных.* Данные обрабатывали при помощи программ Excel 2011 (Microsoft, США) и Prism 6.0 (GraphPad, США). Использованные статистические тесты приведены в разделе результаты. Уровень статистической значимости  $p < 0.05$ .

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ***1.1. Оценка влияния вживления телеметрических датчиков на двигательную и поведенческую активность животных***

Вживление датчика, его масса и расположение могли негативно повлиять на общее состояние животных, поведенческую, прежде всего, двигательную, активность мышей и, тем самым, исказить результаты регистрации гемодинамических показателей при проведении нагрузочных тестов. Нами была проведена экспериментальная оценка применимости метода телеметрической регистрации физиологических показателей у мышей с датчиками и интактных/контрольных животных в комплексных экспериментах. Для оценки общего состояния мышей на протяжении 8 нед. эксперимента регистрировали их массу тела. Мыши относительно легко переносили операцию по имплантации датчика и к 5 сут. после операции масса тела оперированных животных не отличалась от величин до операции и массы тела

интактных особей. Восстановление поведенческой активности (обустройство гнезда, подвижность в клетке) происходило, в среднем, также к 5-6 сут. после операции.

Наблюдение за массой тела мышей за 8 нед. эксперимента не выявило различий между группами ( $F(1,64)=1.21$ ,  $p=0.2755$ , табл. 1). Привес мышей разных групп также не различался ( $F(2,128)=1.12$ ,  $p=0.3295$ ). Максимальная произвольная сила передних и задних конечностей, и время удержания на вращающемся стержне у оперированных мышей и интактных особей не различались ни через 3, ни через 8 нед. после вживления датчиков АД (табл. 1).

Двигательная и исследовательская активность мышей при тестировании в «открытом поле» (табл. 1), в целом, не различались у животных двух групп при тестировании через 3 и 8 нед. после имплантации датчиков. Единственным обнаруженным отличием являлось снижение скорости движения мышей с датчиком на  $11\pm 3\%$  через 8, но не через 3 нед. после имплантации датчика; влияние фактора «группа» на общую вариабельность данных не достигало уровня значимости ( $F(1,65)=3.65$ ,  $p=0.0605$ ). Вклад фактора «группа» в общую вариабельность поведенческих показателей составлял 0-3%, что контрастирует с вкладом индивидуальных различий, составлявшим 45-67%.

**Таблица 1.** Параметры двигательной активности в тесте "Открытое поле", мышечная сила и время удержания на ротароде интактных ( $N=42$ ) и оперированных ( $N=24$ ) мышей ( $m\pm sem$ ). Статистика: \* -  $p<0.05$  ОПЕР против ИНТ; # -  $p<0.05$  3 против 8 нед., пост-тест Сидака.

Параметр		Время после имплантации датчика			
		3 недели		8 недель	
		ИНТ	ОПЕР	ИНТ	ОПЕР
Масса тела (г)		24.1±0.4	24.6±0.6	27.8±0.3	27.8±0.6
Сила хвата (г/кг)	передние лапы	171±5	163±6	184±6 #	182±6 #
	задние лапы	164±4	165±5	155±5	160±7
Время удержания на ротароде (с)		116±5	122±6	125±4	123±7
Суммарный пройденный в ОП путь (м)		80.2±3.2	75.8±3.1	70.6±2.1	63.7±2.5
Средняя скорость ходьбы в ОП (м/мин)		4.95±0.13	4.80±0.18	4.35±0.12	3.86±0.14*

Двигательная активность в беговом колесе домашней клетки. Через 3 нед. после операции среднесуточный пробег мышей с датчиком был на  $34\pm 5\%$  ниже, чем у интактного контроля (табл. 2,  $F(1,66)=9.24$ ,  $p=0.0034$ ). Второе тестирование через 8 нед. после операции не выявило различий в пробегаемой дистанции ( $F(1,66)=0.20$ ,  $p=0.6566$ ).

В ходе каждого из 6-суточных тестирований среднесуточная дистанция снижалась (3 нед. –  $F(5,330)=6.22$ ,  $p<0.0001$ ; 8 нед. –  $F(5,330)=6.75$ ,  $p<0.0001$ ), что сходно у обеих групп. Снижение пройденной дистанции, по видимому, обусловлено затуханием новизны, привыканием: после 4-недельного перерыва между тестированиями дистанция увеличилась по сравнению с величинами в последний день предыдущего тестирования ( $3.77\pm 0.30$  и  $5.16\pm 0.48$  км/день в последний день 3-нед. и первый день 8-нед. тестирования соответственно,  $p<0.05$ , тест Стьюдента). Важно отметить, что индивидуальные различия вносили гораздо больший вклад в вариабельность показателя дистанции бега (32% от общей вариации), чем фактора «группа» (2%).

Средняя скорость бега интактных и оперированных мышей не различалась ни через 3, ни через 8 нед после операции. В пределах каждого 6-сут. мониторинга скорость бега последовательно повышалась ( $F(5,310)=21.12$ ,  $p<0.0001$  и  $F(5,310)=31.05$ ,  $p<0.0001$  на 3 и 8 нед. соответственно), предположительно, вследствие выработки навыка бега, повышения

мышечной силы, выносливости или сочетания этих факторов. Наблюдалось снижение скорости бега с последнего дня 3-нед. теста по сравнению с первым днем бега в 8-нед. тесте ( $22.4 \pm 0.6$  и  $20.3 \pm 0.5$  м/мин соответственно;  $p < 0.05$ , тест Стьюдента). Скорости бега в конце первого периода тестирования и в конце второго периода тестирования были схожи ( $22.4 \pm 0.6$  и  $23.9 \pm 0.6$  соответственно;  $p > 0.05$ , тест Стьюдента).

Результаты эксперимента 1.1 позволяют заключить, что имплантация датчиков не оказывает выраженного негативного влияния на общее состояние животных и не изменяет их двигательную активность при условии достаточного послеоперационного восстановления.

**Таблица 2.** Параметры двигательной активности в беговом колесе домашней клетки системы «Феномастер» интактных (N=42) и оперированных (N=24) мышей (среднее $\pm$ SEM).

Статистика: \$ -  $p < 0.05$  ОПЕР против ИНТ, пост-тест Сидака.

Параметр	День теста	Время после операции			
		3 недели		8 недель	
		ИНТ (n=42)	ОПЕР (n=24)	ИНТ (n=42)	ОПЕР (n=24)
Среднесуточный пробег, км	1 сут.	$5.34 \pm 0.43$	$4.59 \pm 0.59$	$5.49 \pm 0.44$	$4.60 \pm 0.57$
	6 сут.	$4.58 \pm 0.36$	$2.88 \pm 0.45$ \$	$4.35 \pm 0.45$	$3.94 \pm 0.64$
Средняя скорость, м/мин	1 сут.	$17.91 \pm 0.53$	$18.90 \pm 0.91$	$20.70 \pm 0.54$	$19.64 \pm 0.84$
	6 сут.	$23.13 \pm 0.78$	$21.12 \pm 0.96$	$23.98 \pm 0.65$	$23.59 \pm 1.10$

### 1.2 Подходы к оценке гемодинамического обеспечения двигательной активности

Физическая нагрузка (бег), как фактор, возмущающий стабильное состояние сердечно-сосудистой системы, широко используется для исследования ее функционального состояния. В эксперименте 1.2 мы проанализировали применимость известных нагрузочных тестов (ходьба в ОП и бег на тредбане) с использованием фармакологических блокаторов и предложили новый метод оценки гемодинамической стоимости бега, основанный на регистрации двигательной активности мышей при произвольном беге в колесе.

*Гемодинамические реакции в «открытом поле».* Суммарный пройденный путь в ОП после введения атенолола и комбинации атенолола и ипратропия снижался, однако скорость движения мышей при введении А, И или их комбинации не изменялась. После инъекции диазепама мыши двигались со скоростью на 50% выше, чем в контрольных тестах (табл. 3).

Для анализа реакций сердечно-сосудистой системы на двигательную активность был выбран диапазон 0-8 м/мин, для которого были собраны данные от всех животных при всех воздействиях. Среднее артериальное давление контрольных мышей в ОП в отсутствие движения было на 28-30 мм рт. ст. выше, чем в домашней клетке и не изменялось с увеличением скорости бега ни в контрольных тестах, ни при применении блокаторов.

ЧСС в контрольном эксперименте была на 220-240 уд/мин выше, чем в домашней клетке и практически не менялась при увеличении скорости ходьбы (табл. 3). После введения ипратропия ЧСС увеличивалась на  $18 \pm 4$  уд/мин при скорости бега 8 м/мин. Атенолол значительно снижал ЧСС при всех скоростях бега на 120-140 уд/мин по сравнению с мышами, получавшими ФР ( $F(1,13)=30.43$ ,  $p < 0.001$ , табл. 3), но ЧСС не зависела от скорости движения ( $+31 \pm 8$  уд/мин). При введении обоих блокаторов ЧСС не изменялась в зависимости от скорости и значения были сходны со значениями ЧСС мышей, получавших атенолол (табл. 3). При введении диазепама ЧСС возрастала до  $750 \pm 11$  уд/мин при скорости движения 8 м/мин. Применение анксиолитика позволило выявить зависимость ЧСС от скорости бега

( $F(1.69,11.82)=23.95$ ,  $p=0.001$ ), а значения ЧСС в покое были ниже, чем у мышей после инъекции ФР ( $F(1,15)=4.84$ ,  $p=0.0440$ ).

**Таблица 1.** Параметры двигательной активности и ЧСС мышей в «открытом поле» на фоне применения различных блокаторов и их комбинации. Статистика: \* –  $p<0.05$ ; \*\*\* –  $p<0.01$ ; \*\*\* –  $p<0.005$  по сравнению с тестированием на фоне ФР, тест Бонферрони.

Воздействие	Дистанция, м	Ср. скорость, м/мин	ЧСС (0 м/мин), уд/мин	ЧСС (8 м/мин), уд/мин
ФР (n=9)	34.2 ± 4.8	2.84 ± 0.22	724±21	763±8
Ипратропиум (И), 2 мг/кг (n=8)	31.1 ± 4.0	2.97 ± 0.24	764±9	783±7
Атенолол (А), 2 мг/кг (n=8)	18.3 ± 3.1*	2.15 ± 0.14	612±13*	644±17*
А, 2 мг/кг +И, 2 мг/кг, (n=8)	15.7 ± 2.6**	2.14 ± 0.17	615±15*	629±15*
Диазепам, 5 мг/кг (n=8)	28.2 ± 4.2	4.43 ± 0.27***	663±19*	745±13

#### Гемодинамическое обеспечение двигательной активности при беге на тредбане

Сразу, после помещения мышей в экспериментальную установку, САД увеличивалось на 25-30 мм рт.ст. в отсутствие движения. САД не изменялось при увеличении скорости бега с 6 до 18 м/мин ни в контрольных забегах, ни при введении фармакологических блокаторов.

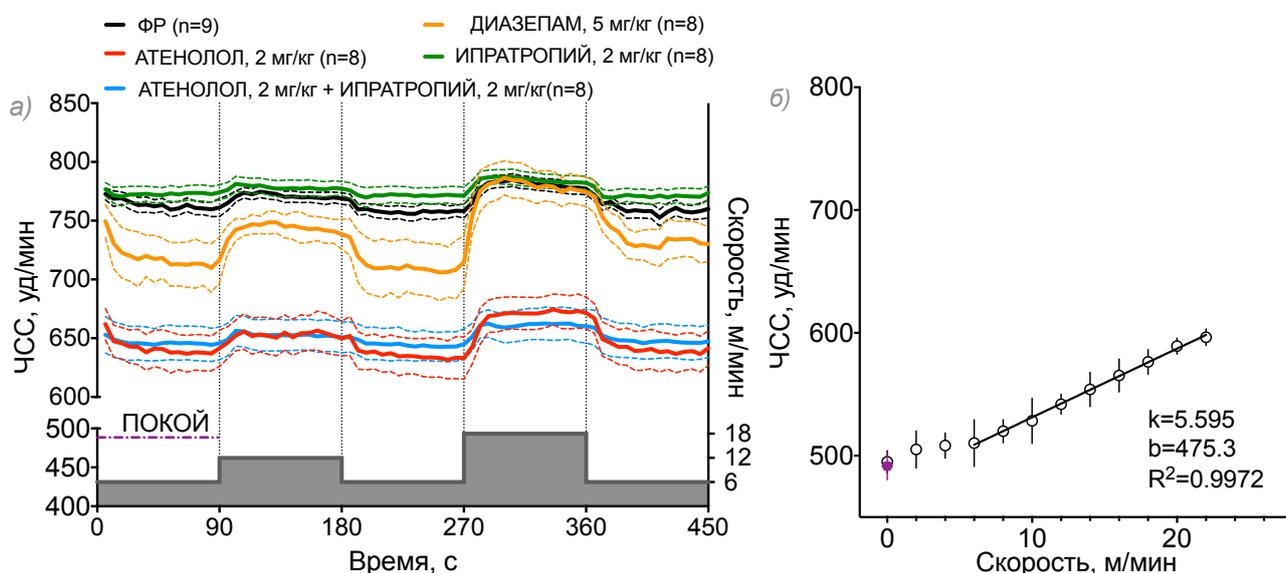
При увеличении скорости движения у мышей с 6 до 18 м/мин наблюдали небольшое, но значимое увеличение ЧСС на 24±2 уд/мин ( $F(1.610,12.88)=25.79$ ,  $p<0.0001$ , рис. 1). У мышей с ипратропиум ЧСС был практически таким же, как и у мышей с ФР ( $F(1,14)=1.35$ ,  $p=0.2645$ ), и не зависел от скорости бега ( $F(1.021,6.127)=3.37$ ,  $p=0.1148$ , табл. 4). При введении атенолола ЧСС мышей была снижена на 120-130 уд/мин по сравнению с ФР при всех скоростях движения ( $F(1,14)=69.41$ ,  $p<0.0001$ , табл. 4) и увеличивалась при росте скорости на 36±5 уд/мин ( $F(1.825,10.95)=31.73$ ,  $p<0.0001$ , табл. 4). При введении обоих блокаторов зависимость ЧСС от скорости бега присутствовала, но была очень слабо выражена - прирост составлял 17±3 уд/мин ( $F(1.226,6.131)=38.21$ ,  $p=0.006$ , табл. 4). ЧСС на фоне введения А+И была значительно ниже значений у мышей с ФР ( $F(1,13)=92.84$ ,  $p<0.0001$ , табл. 4) и близка к значениям у мышей с введением только атенолола. Наиболее выраженную зависимость ЧСС от скорости бега наблюдали у мышей с инъекцией диазепама. ЧСС при скорости 18 м/мин в этих опытах была на 79±19 уд/мин выше, чем при беге со скоростью 6 м/мин ( $F(1.058,5.292)=16.47$ ,  $p=0.0083$ , табл. 4). По сравнению с контрольными забегами, ЧСС были ниже ( $F(1,13)=5.94$ ,  $p=0.03$ , рис. 1а) при низких скоростях бега, а при скорости 18 м/мин значения ЧСС не отличались.

**Таблица 2.** ЧСС во время бега мышей на тредбане с разными скоростями (\* -  $p<0.05$  по сравнению с ФР, тест Бонферрони) и параметры линейной аппроксимации зависимости ЧСС от скорости бега.

Воздействие	Скорость бега, м/мин				Регрессия	
	0	6	12	18	k	b
ФР (n=9)	738±44	757±6	771±5	781±5	1.97±0.60	746±8
Ипратропиум, 2 мг/кг (n=8)	735±21	772±7	778±7	784±6	1.05±0.76	765±10
Атенолол, 2 мг/кг (n=8)	627±17*	635±16*	653±15*	672±14*	3.04±1.72	617±22
Атенолол, 2 мг/кг + Ипратропиум 2 мг/кг, (n=8)	634±15*	644±13*	652±13*	662±14*	1.47±1.52	635±19
Диазепам, 5 мг/кг (n=8)	707±20	710±23*	744±10*	780±13	5.82±1.85	675±24

*Гемодинамические параметры мышей при беге в колесе.* В качестве альтернативного - тестированию на тредбане - подхода был проведен мониторинг САД и ЧСС при беге в колесе, расположенном в домашней клетке. Имея неограниченный доступ к колесу, мыши активно его использовали, среднесуточная дистанция составляла  $6.5 \pm 0.3$  км/сут, средняя скорость бега –  $22 \pm 1$  м/мин, максимальная – 40 м/мин. Со скоростью до 22 м/мин бегали все мыши ( $n=8$ ), поэтому диапазон скоростей от 0 до 22 м/мин был выбран для анализа.

САД во время бега составляло  $105 \pm 1$  мм рт. ст. и не менялось при увеличении скорости бега. ЧСС в покое составила  $484 \pm 9$  уд/мин, несколько возрастала – при беге со скоростью 2-4 м/мин, и линейно увеличивался на  $5.7 \pm 0.2$  уд/мин при увеличении скорости на 1 м/мин. При скорости 22 м/мин ЧСС составлял  $597 \pm 13$  уд/мин, что на  $113 \pm 16$  уд/мин превышает величины в покое (рис. 1б). Линейная регрессия с весовым коэффициентом  $1/sd^2$  характеризовалась  $R^2=0.9972$  (рис. 1б). Таким образом, в эксперименте 1.2 было обнаружено, что реакции ЧСС на физическую нагрузку у мышей не могут быть исследованы в классических нагрузочных тестах, ввиду высокой стресс-реактивности мышей. Для исследования зависимости ЧСС от уровня физической активности предложен метод телеметрической регистрации АД и ЧСС при произвольном беге в колесе «домашней клетки».



**Рисунок 1.** Зависимость ЧСС от скорости бега: а) при беге на тредбане и б) в колесе «домашней клетки» (скорости от 2 до 22 м/мин, шаг интервала усреднения – 2 м/мин).

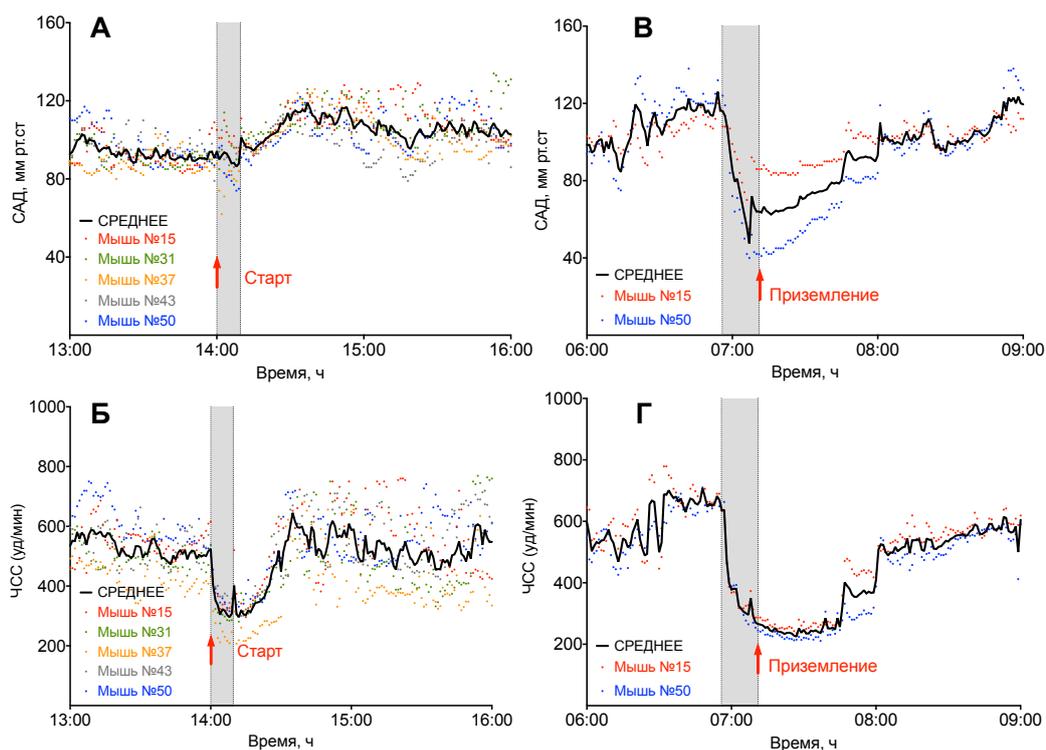
## 2. Гемодинамические параметры мышей в космическом полете

В данной работе впервые проведена непрерывная регистрация артериального давления и частоты сокращений сердца у мышей в длительном космическом полете и в ходе послеполетного восстановления.

*Гемодинамические параметры при запуске и посадке.* Во время запуска биоспутника, САД было в целом без изменений (рис. 2А), в то время как ЧСС резко и значительно падала на 100 уд/мин в течение 1 мин, достигая максимального снижения  $214 \pm 22$  уд/мин через 5-6 мин после старта (рис. 2Б). После выхода спутника на орбиту АД и ЧСС начинали постепенно повышаться и достигли значений  $124 \pm 4$  мм рт. ст. и  $722 \pm 29$  уд/мин (рис. 2А, 2Б) соответственно через 40-50 мин после старта. Во время снижения было обнаружено резкое снижение и АД (на 68 мм рт. ст., рис. 2В), и ЧСС (на 434 уд/мин, рис. 2Г) с последующим восстановлением в течение не менее 40 мин.

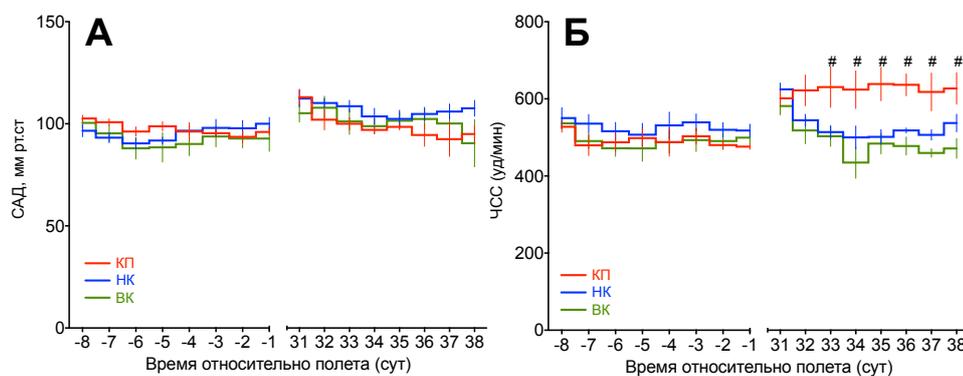
*Суточные гемодинамические параметры мышей в космическом полете.* Мышей групп космический полет (КП) и наземный контроль (НК) кормили в автоматическом режиме 6 раз в

день каждые 4 часа, мыши группы виварный контроль (ВК) имели постоянный доступ к корму. Каждое кормление сопровождалось поведенческой активацией и соответствующим повышением ЧСС и САД. Этот прирост гемодинамических параметров, вызванный кормлением, у мышей в полете был почти в 2 раза больше, чем у наземного контроля (АД: КП –  $9.5 \pm 3.1$  мм рт. ст., НК –  $5.1 \pm 2.0$  мм рт. ст.,  $F(1,187)=41.76$ ,  $p<0.0001$ ; ЧСС: КП –  $94 \pm 21$  уд/мин, НК –  $61 \pm 25$  уд/мин,  $F(1,187)=38.18$ ,  $p<0.0001$ ). Выраженность реакции не изменялась за 30 сут. полета/наблюдения за наземным контролем (САД:  $F(30,187)=0.80$ ,  $p=0.7589$ ; ЧСС:  $F(30,187)=0.65$ ,  $p=0.9188$ ). Вызванные кормлением реакции гемодинамических параметров мышей превосходили по величине циркадную вариабельность этих параметров.



**Рисунок 2.** САД и ЧСС мышей во время старта (А, Б) и приземления (В, Г). Серым обозначены периоды действия перегрузок. Черная линия – усредненные данные, точки – индивидуальные значения АД и ЧСС.

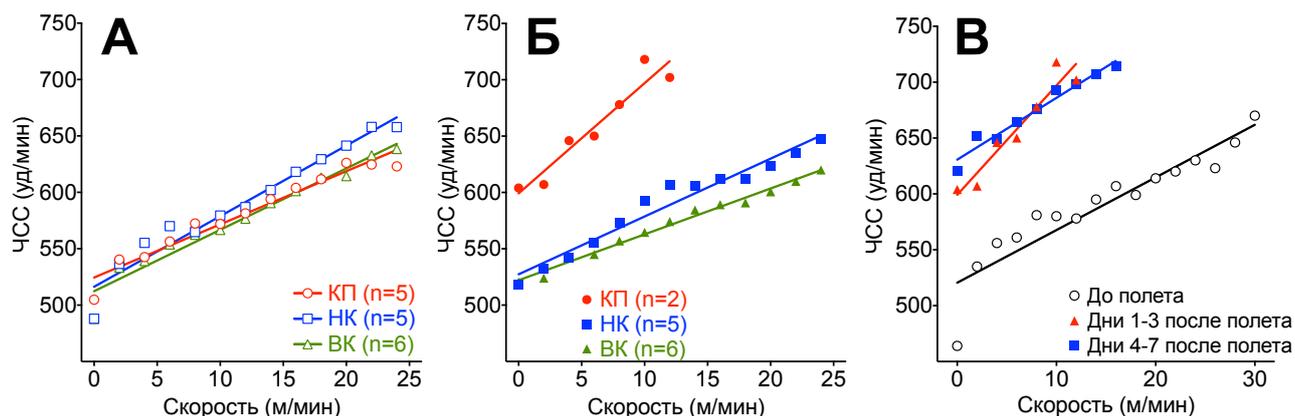
*Гемодинамические параметры мышей в послеполетный период.* После возвращения биоспутника, непрерывная регистрация гемодинамических параметров была продолжена в клетках автоматического сбора данных «Феномастер» в течение 7 сут. В период реадaptации АД мышей, совершивших космический полет, не отличалось от давления мышей наземной и виварной контрольных групп ( $F(2, 10)=0.68$ ,  $p=0.5257$ ). ЧСС была увеличена, тахикардия сохранялась вплоть до 7 дня восстановительного периода ( $F(2, 10)=5.54$ ,  $p=0.0240$ , рис. 3).



**Рисунок 3.** Среднесуточное САД (А) и ЧСС (Б) мышей во время 7-сут. мониторинга в клетках системы «Феномастер в восстановительный период». # -  $p<0.05$  vs. НК и vs. ВК, тест Тьюки.

В пред- и послеполетный период были зарегистрированы значения гемодинамических параметров у мышей при произвольной двигательной активности в беговом колесе. После

полета мышь КП продемонстрировала почти максимальное увеличение ЧСС при беге с относительно низкими скоростями (рис. 4Б). Кроме того, наклон зависимости ЧСС от скорости бега у мыши после космического полета был вдвое более крутым, чем до полета или у мышей НК и ВК ( $9.79 \pm 1.29$  (уд/мин)/(м/мин) в 1-3 день после полета,  $4.71 \pm 0.51$  (уд/мин)/(м/мин) – до полета,  $F(1,19)=8.39$ ,  $p=0.0092$ , рис. 4В). В первые 3 дня после приземления, в отсутствие нагрузки ЧСС мыши по сравнению с дополетными значениями была выше на 50 уд/мин, ( $F(1,19)=28.15$ ,  $p<0.0001$ , рис. 4В). Во второй половине периода восстановления (4-7 сут.) наклон кривой снизился до  $5.53 \pm 0.43$  (уд/мин)/(м/мин), что не отличалось от предполетных значений ( $F(1,21)=0.54$ ,  $p=0.4723$ ), но ЧСС оставалась повышенной (рис. 4В).



**Рисунок 4.** Линейные зависимости ЧСС от скорости бега: в предполетном тестировании разных групп мышей (А), после полета у разных групп мышей (Б), и у мыши, протестированной после космического полета в первой и второй половине срока послеполетного тестирования по сравнению с предполетными значениями (В).

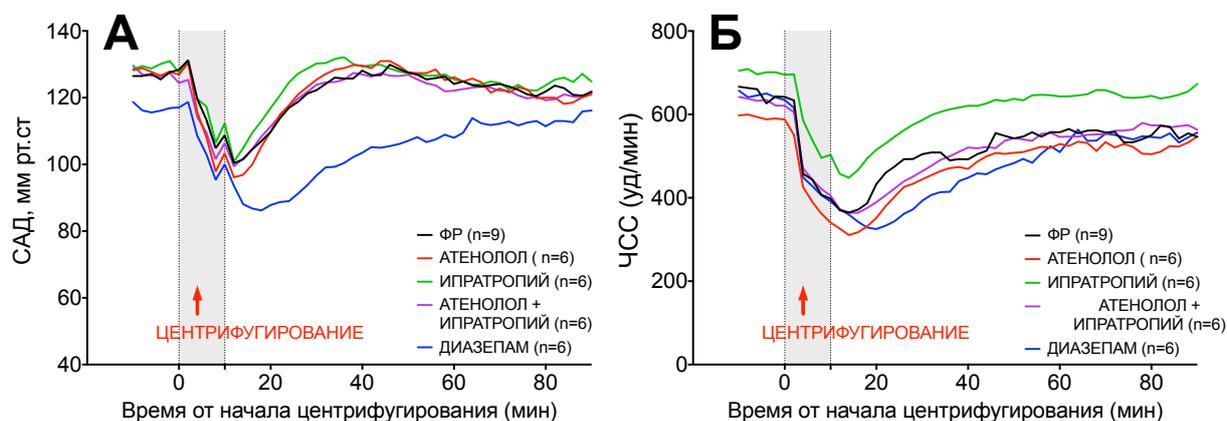
В эксперименте 2 получены свидетельства адаптации сердечно-сосудистой системы мышей к микрогравитации и потери адаптации к уровню Земной гравитации за 30 суток космического полета: ярко выраженная гемодинамическая реакция на гравитационный стресс во время приземления спутника, послеполетная тахикардия, увеличенный ответ ЧСС на физическую нагрузку. Таким образом, реакции сердечно-сосудистой системы на микрогравитацию мелких четвероногих мышей сходны с реакциями более крупных животных и человека. Это указывает на существование мало- или независимых от размеров тела механизмов адаптации сердечно-сосудистой системы млекопитающих к микрогравитации.

### 3.1 Гемодинамические параметры при воздействии линейных перегрузок (центрифугирование).

При запуске космического аппарата у мышей наблюдалась брадикардия, дополнявшаяся гипотонией при действии спусковых перегрузок, что принципиально отличается от наблюдаемой у человека и более крупных животных при действии перегрузок «спина-грудь» тахикардии. Мы решили исследовать реакцию мышей на перегрузки в модельном эксперименте на центрифуге. С целью оценки вклада симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы в эту реакцию при помощи вживляемых телеметрических датчиков регистрировали АД и ЧСС на фоне действия блокаторов. Подготовка мышей к эксперименту была выполнена французскими специалистами А. Vanden-Bossche и J. Bourreau.

В контрольных опытах после начала центрифугирования АД мышей снижалась на 22%, а ЧСС на 56% (рис. 5, табл. 5). Реакция не угасала при повторении центрифугирования с

интервалами 3 сут. При введении холинолитика реакция ЧСС уменьшалась на 13% ( $p=0.0089$ ), адreno-блокатор не влиял на реакцию ЧСС, сочетание адрено- и холинолитика также не изменяло реакцию ЧСС по сравнению с контролем. При введении диазепама падение ЧСС было на 10% более выраженным, чем у тех же животных в контрольных опытах ( $p=0.0691$ ). Время полувосстановления ЧСС после центрифугирования в контрольных опытах составляло 9.3 мин, не изменялось при действии атенолола и ипратропия, а при введении диазепама возрастало втрое (табл. 5).



**Рисунок 5.** Реакция САД (А) и ЧСС (Б) мышей на моделируемые перегрузки. Усредненные значения для мышей с одним веществом. Серым выделением обозначен период действия перегрузок (три пика 2G-3G-5G в течение 10 мин).

**Таблица 5.** Гемодинамические реакции мышей на центрифугирование и время полувосстановления при действии различных блокаторов. \* -  $p<0.05$  vs. ФР.

Воздействие	Максимальное падение		Время полувосстановления	
	САД (мм рт. ст.)	ЧСС (уд/мин)	$T_{1/2САД}$ (мин)	$T_{1/2ЧСС}$ (мин)
ФР	28±3	301±23	4.5±2.3	9.3±3.9
Ипратропий, 2 мг/кг	29±4	261±24*	2.8±2.4	9.2±3.0
Атенолол, 2 мг/кг	35±4	296±16	3.6±1.4	10.2±2.8
А, 2 мг/кг+И, 2 мг/кг	33±4	282±24	3.8±2.3	13.7±5.3
Диазепам	32±3	331±21	20.2±16.4*	26.1±17.0

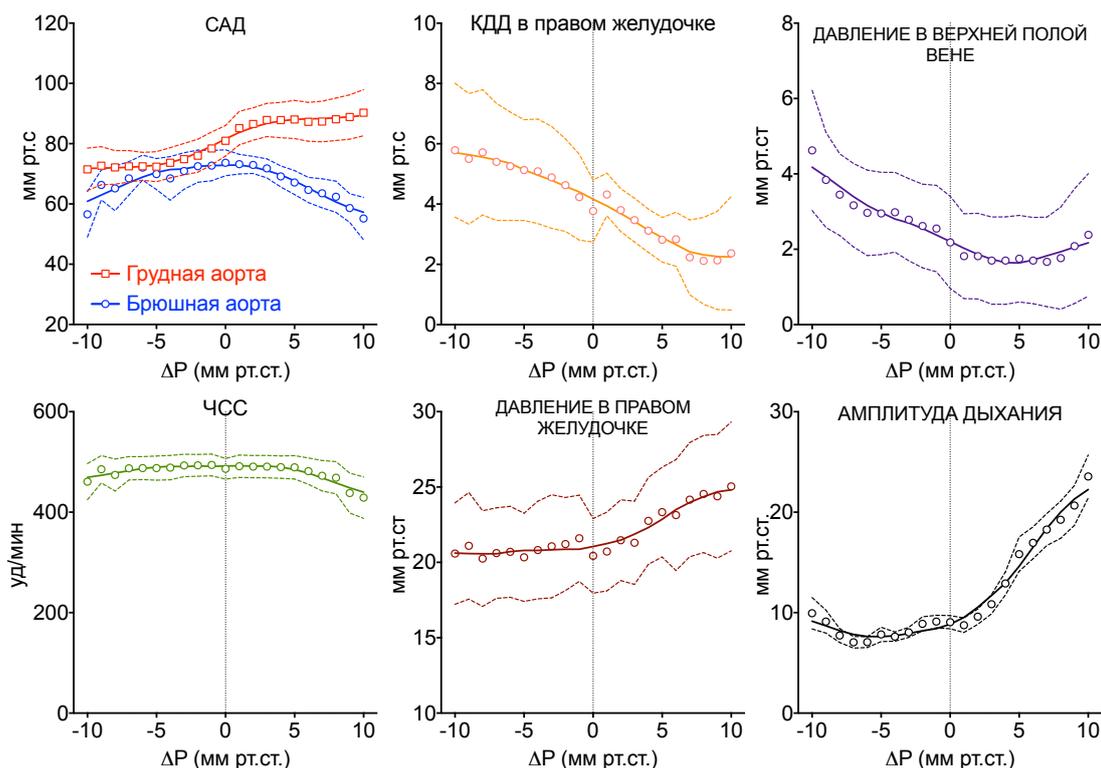
Результаты эксперимента 3.1 в сопоставлении с опубликованными литературными данными позволяют заключить, что брадикардическая реакция мышей на перегрузки обусловлена вестибуло-кардиальными влияниями, специфичными для мелких животных (мышей и крыс) Согласно литературным данным, у крыс, подвергавшихся центрифугированию (до 3 G), наблюдают схожее снижение ЧСС, причем это снижение блокируется разрушением среднего уха и удалением эфферентного влияния вестибулярных центров [Gotoh и др., 2003]

### 3.2 Гемодинамические параметры при изменении транслегочного давления

Для оценки влияния «механического сдавливания» при действии перегрузок в остром эксперименте на наркотизированных мышях линии C57Bl/6 ( $n=15$ ) регистрировали гемодинамические реакции в компрессионной камере при изменении транслегочного давления в обоих направлениях (нагнетание/разряжение).

Изменение давления в компрессионной камере вызывало перераспределение крови. Так, при понижении давления в камере на 10 мм рт. ст. давление в полый вене и конечное

диастолическое давление (КДД) в правом желудочке увеличивались в 2 раза (с  $2.2 \pm 1.2$  до  $4.6 \pm 1.6$  и с  $3.8 \pm 1.0$  до  $5.8 \pm 2.2$  мм рт. ст. соответственно, рис. 6). При увеличении давления в камере на 10 мм рт. ст. венозное давление уменьшалось с  $2.2 \pm 1.2$  до  $1.8 \pm 1.3$  мм рт. ст., КДД – с  $3.8 \pm 1.0$  до  $2.1 \pm 1.6$  мм рт. ст.. Характер изменений давления в брюшной и грудной аорте был существенно различным, что свидетельствует, в частности, об уместности использованной нами модели. ЧСС при уменьшении давления несколько снижалась (с  $486 \pm 21$  до  $461 \pm 36$  уд/мин), а при увеличении давления уменьшалась до  $429 \pm 41$  уд/мин, что несопоставимо меньше, чем изменения ЧСС при центрифугировании (табл. 5). Таким образом, «механическое сдавливание» не вызывает изменений ЧСС, сопоставимых с реакциями мышей на действие линейных перегрузок.



**Рисунок 6.** Среднее артериальное давление (САД) в грудной и брюшной аорте, конечно-диастолическое давление (КДД) в правом желудочке, давление в верхней полой вене, частота сердечных сокращений (ЧСС), давление в правом желудочке и амплитуда дыхания - в зависимости от изменения давления в компрессионной камере,  $\text{mean} \pm \text{sem}$ ,  $n=20$ .

### 3.3 Правожелудочковое давление при антиортостатической пробе.

С целью оценки выраженности перераспределения жидкости у мышей, в остром эксперименте было зарегистрировано правожелудочковое давление при антиортостатической пробе ( $-30^\circ$ ). При повороте мыши головой вниз на столике систолическое правожелудочковое давление, составлявшее в покое  $29.8 \pm 0.1$  мм рт. ст., снижалось на  $3.6 \pm 3.3\%$ , ЧСС – на  $\approx 1\%$ , что несопоставимо с величинами реакций при действии линейных перегрузок. Результат эксперимента 3.3 подтверждает предположение о незначительности гидростатического градиента давления у мышей.

### 3.4 Гематологические показатели, содержание воды в тканях и объем крови при вывешивании у мышей

В эксперименте 3.4 была проведена оценка динамики содержания воды в тканях мышей и их гематологических показателей, как индикаторов перераспределения жидкости, в модели антиортостатического вывешивания.

Содержание воды (СВ) в тканях мозга ( $F(3, 39)=1.04$ ,  $p=0.3867$ , табл. 6) и легких ( $F(3, 38)=1.37$ ,  $p=0.2663$ , табл. 6) при вывешивании практически не изменялось. Ткань почек в первые дни вывешивания теряла воду ( $F(3, 38)=7.14$ ,  $p=0.0006$ ); после чего на 7 сутки СВ практически достигались фоновые значения (табл. 6). В ткани слюнных желез СВ постепенно (тест на линейный тренд –  $R^2=0.3872$ ,  $p<0.0001$ ) увеличивалось и на 7 сутки вывешивания значимо увеличилось. СВ в мышцах голени ( $F(3, 38)=8.63$ ,  $p=0.0002$ ) на 1 и 3 сутки вывешивания снижалось  $\approx$  на 1%, после чего возвращалось к фоновым значениям, снижение СВ в мышцах плеча статистически не значимо ( $F(3, 38)=2.65$ ,  $p=0.0628$ , табл. 6).

**Таблица 6.** Содержание воды в различных тканях мышей, некоторые гематологические параметры и объем крови в динамике на разных сроках вывешивания, среднее $\pm$ SEM, серым обозначено статистически значимое отличие значений от фона ( $p<0.05$ ).

Ткань	Содержание воды (%)					
	Фон (n=12)	12ч (n=12)	1 сут. (n=12)	2 сут. (n=12)	3 сут. (n=13)	7 сут. (n=14)
Мозг	77.86 $\pm$ 0.08	77.85 $\pm$ 0.08	77.84 $\pm$ 0.05	77.75 $\pm$ 0.07	77.55 $\pm$ 0.09	77.79 $\pm$ 0.09
Легкие	78.61 $\pm$ 0.19	78.52 $\pm$ 0.11	78.43 $\pm$ 0.09	78.36 $\pm$ 0.11	78.08 $\pm$ 0.17	78.59 $\pm$ 0.15
Почки	75.83 $\pm$ 0.16	75.14 $\pm$ 0.19	74.91 $\pm$ 0.22	74.89 $\pm$ 0.16	74.86 $\pm$ 0.15	75.27 $\pm$ 0.15
Слюнные железы	71.04 $\pm$ 0.33	70.96 $\pm$ 0.23	70.60 $\pm$ 0.30	70.95 $\pm$ 0.22	71.29 $\pm$ 0.30	73.18 $\pm$ 0.27
Мышцы голени	75.78 $\pm$ 0.14	75.17 $\pm$ 0.14	75.23 $\pm$ 0.11	75.11 $\pm$ 0.16	74.79 $\pm$ 0.17	75.84 $\pm$ 0.13
Мышцы плеча	76.55 $\pm$ 0.11	76.40 $\pm$ 0.08	76.34 $\pm$ 0.12	76.03 $\pm$ 0.11	75.92 $\pm$ 0.15	76.61 $\pm$ 0.14
<b>Гематологические показатели</b>	<b>Фон (n=26)</b>	<b>12ч (n=23)</b>	<b>1 сут. (n=18)</b>	<b>2 сут. (n=31)</b>	<b>3 сут. (n=18)</b>	<b>7 сут. (n=34)</b>
Гематокрит (%)	44.8 $\pm$ 0.7	45.2 $\pm$ 0.8	43.7 $\pm$ 0.7	42.7 $\pm$ 0.8	41.1 $\pm$ 1.8	41.9 $\pm$ 1.1
Эритроциты ( $10^{12}/л$ )	8.74 $\pm$ 0.21	9.00 $\pm$ 0.16	8.62 $\pm$ 0.13	8.58 $\pm$ 0.19	7.88 $\pm$ 0.39	8.12 $\pm$ 0.25
Гемоглобин (г/л)	139.9 $\pm$ 3.4	142.0 $\pm$ 2.7	136.3 $\pm$ 2.2	135.8 $\pm$ 3.3	124.5 $\pm$ 6.1	126.1 $\pm$ 3.8
V крови (мл/кг)	85.7 $\pm$ 4.5	92.2 $\pm$ 3.2	84.4 $\pm$ 2.4	84.8 $\pm$ 4.3	85.5 $\pm$ 3.7	87.2 $\pm$ 5.9
V плазмы (мл/кг)	48.2 $\pm$ 2.9	50.8 $\pm$ 2.2	46.9 $\pm$ 2.0	50.3 $\pm$ 2.9	51.3 $\pm$ 3.0	53.4 $\pm$ 4.3
Ср. объем клетки (фл)	50.0 $\pm$ 0.5	50.3 $\pm$ 0.5	49.8 $\pm$ 0.5	50.7 $\pm$ 0.6	50.1 $\pm$ 0.7	52.2 $\pm$ 0.7

Гематокрит ( $F(5,144)=2.40$ ,  $p=0.0401$ ), RBC ( $F(5,142)=2.85$ ,  $p=0.0175$ ) и HGB ( $F(5,142)=3.66$ ,  $p=0.0038$ ) за время вывешивания изменялись со сходной динамикой: показатели постепенно снижались, достигая минимума на 3 сут., после чего оставались стабильными (табл. 6). Снижение НСТ на 3 сут. вывешивания составило 8.1 $\pm$ 3.9%. Апостериорный анализ величин НСТ на разных сроках вывешивания на линейный тренд ( $R^2=0.0719$ ,  $p=0.0010$ ) свидетельствует об их прогрессирующем снижении во время вывешивания (табл. 6). Изменение RBC было сходным и составляло 9.8 $\pm$ 4.5% на 3 сут. вывешивания; линейный тренд был значим ( $R^2=0.0738$ ,  $p=0.0009$ ), но различия величин RBC при попарном сравнении не достигали уровня значимости (табл. 6). Содержание гемоглобина значимо отличалось от фоновых значений на 3 и 7 сут. вывешивания и снижение достигало 11.0 $\pm$ 4.3% и 9.9 $\pm$ 2.7% соответственно, также был значим линейный тренд ( $R^2=0.1008$ ,  $p<0.0001$ , табл. 6).

Объем крови мышей, оцененный по разведению синего Эванса за время вывешивания значимо не изменялся ( $F(5,79)=0.36$ ,  $p=0.8775$ , табл. 6). Расчетный объем плазмы за 7 сут. вывешивания также значимо не изменялся ( $F(5,79)=0.68$ ,  $p=0.6413$ , табл. 6).

Сопоставление результатов реакции гематологических показателей и жидкостных объемов на антиортостатическое вывешивание у мышей с данными, полученными на более крупных животных и человеке, позволяет высказать предположение о независимости от размеров организма реакции гематологических показателей на воздействие реальной микрогравитации или моделирование ее эффектов. Снижение гематокрита, а также изменение реологических свойств эритроцитов могут сопровождаться изменением вязкости крови, а значит, и механического (через напряжение сдвига) воздействия на эндотелий сосудов,- что может лежать в основе морфофункциональной перестройки артерий и вен различных сосудистых бассейнов после КП у мышей. Изменения сосудов, в свою очередь, могут быть одной из причин реакций системных гемодинамических показателей, наблюдаемых у мышей во время и после КП.

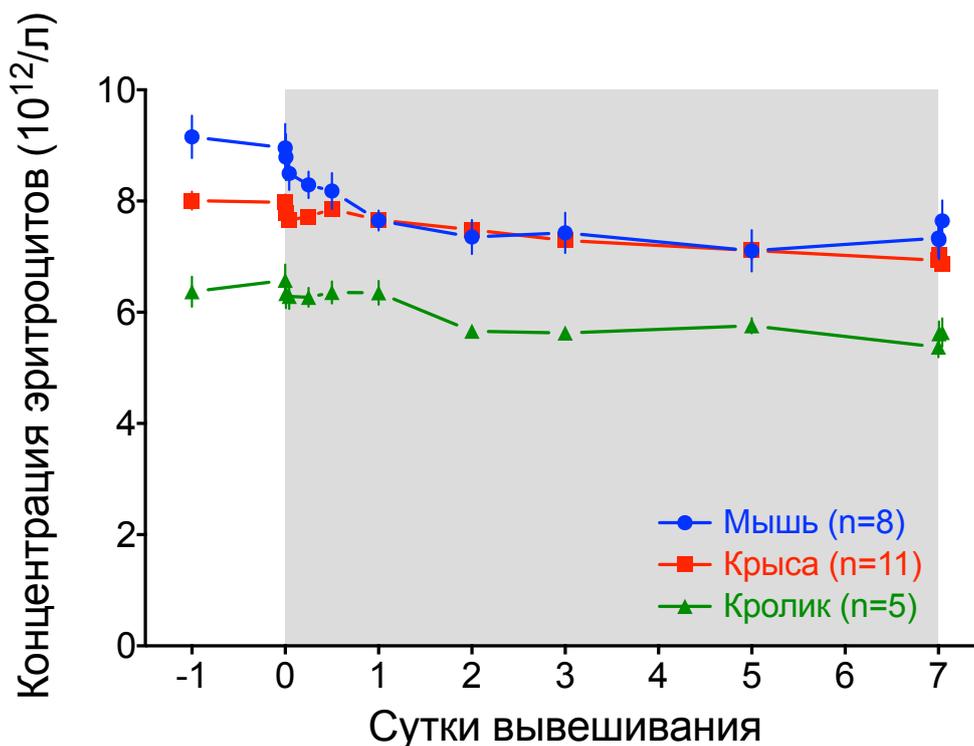
### **3.5 Изменение количества эритроцитов и жидкостных объемов при вывешивании в зависимости от размера тела**

Поскольку: а) при оценке реакции гематологических показателей и объема крови мышей на вывешивание нами были обнаружены, с одной стороны, снижение показателей красной крови, а с другой – отсутствие выраженных изменений объема крови, б) при измерении гематологических реакций при антиортостатической пробе и изменении транслегочного давления были получены несколько противоречивые данные о выраженности перераспределения жидкости у мышей, мы посчитали крайне интересным провести экспериментальную оценку аллометрической зависимости реакции гематологических показателей и жидкостных объемов при моделируемом воздействии микрогравитации. Для этого сначала была исследована динамика гематологических показателей у мышей, крыс и кроликов в течение 7-суточного вывешивания, а затем проведена оценка объема крови и интерстициальной жидкости по фармакокинетическим показателям флуоресцентно-меченных декстрана (M=150 кДа) и инулина (M=4 кДа).

*Анализ количества эритроцитов и жидкостных объемов.* Исходно концентрация эритроцитов была наибольшей у мышей, промежуточной – у крыс, наименьшей – у кроликов (рис. 7). Концентрация эритроцитов (red blood cell, RBC) при вывешивании снижалась у всех трех видов животных, первое значительное снижение RBC у мышей (на  $7.6 \pm 3.6\%$  по сравнению с фоном) наблюдали уже через 6 ч после вывешивания, у крыс – на 3 день, у кроликов – на 2 день вывешивания. В целом, RBC постепенно снижалась в течение первых трех дней, после чего оставалась пониженной до 7 дня вывешивания. Следует, однако, отметить более сложный, двухфазный, характер снижения концентрации эритроцитов у крыс и кроликов: первое снижение сразу после вывешивания и затем – на вторые сутки антиортостаза.

Далее проводили анализ аллометрической зависимости параметров от размера тела. Число эритроцитов было прогрессивно меньше по мере увеличения размера тела ( $F(2,21)=20.21$ ,  $p<0.001$ , рис. 10) и снижалось при вывешивании ( $F(1,21)=101.1$ ,  $p<0.0001$ ).

Зависимости RBC в покое и при вывешивании от массы тела (рис. 8) характеризовались общим показателем степени  $-0.054 \pm 0.008$  ( $F(1,44)=1.54$ ,  $p=0.2208$ ), а не разными показателями для двух кривых ( $0.063 \pm 0.010$  и  $0.044 \pm 0.011$  для АТТ и НЛУ соответственно). Однако, коэффициенты  $Y_0$  двух зависимостей выражено различались в «прикрепленном» ( $10.73 \pm 0.49$ ) и «вывешенном» ( $8.66 \pm 0.40$ ) состоянии ( $F(1,44)=12.48$ ,  $p=0.0010$ ). Таким образом, одинаковый показатель степени зависимостей для АТТ и НЛУ свидетельствует об относительной независимости снижения RBC при вывешивании от размера тела.

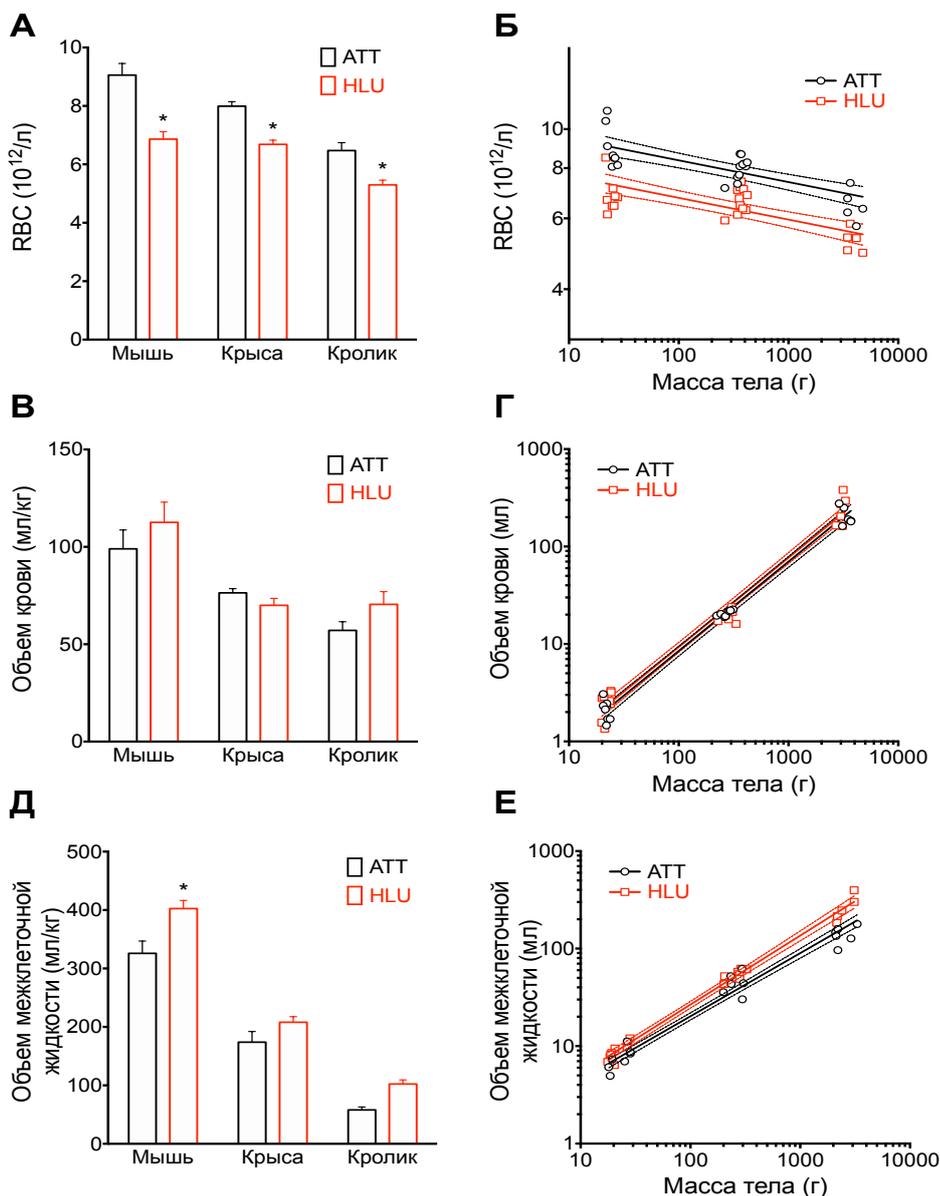


**Рисунок 7.** Число эритроцитов у мышей, крыс и кроликов в течение 7-суточного вывешивания, среднее±SEM.

Объем крови оценивали по объему распределения декстрана, большая молекулярная масса которого препятствует его экстравазации. Вариативность поправленных на массу тела величин объема крови (рис. 8) определялась фактором «вид» ( $F(2,38)=19.22$ ,  $p<0.0001$ ), но не «вывешивание» ( $F(1,38)=1.37$ ,  $p=0.2484$ ). Аллометрические зависимости объема крови для «прикрепленных» и «вывешенных» животных (рис. 8) были неразличимы и имели  $Y_0=0.131\pm 0.015$  и показатель  $N$  близкий к единице и равный  $0.917\pm 0.020$  для обеих зависимостей; гипотеза о различии коэффициентов  $Y_0$  и  $N$  статистическими методами не подтверждалась ( $F(1,40)=0.43$ ,  $p=0.5146$  и  $F(1,40)=0.00$ ,  $p=0.9609$  для  $Y_0$  и  $N$  соответственно). Таким образом, независимо от массы тела объем крови при вывешивании не изменялся.

Объем межклеточной жидкости оценивали по объему распределения инулина, который за счет своей небольшой молекулярной массы распределяется по сосудистому руслу и межклеточному пространству. Анализ варибельности объема межклеточной жидкости, нормированного на массу тела (рис. 8), выявил значимый вклад факторов: «вид животного» ( $F(2,35)=189.2$ ,  $p<0.0001$ ) и «вывешивание» ( $F(1,35)=7.68$ ,  $p=0.0002$ ). Следует отметить, что перераспределение жидкости в краниальном направлении можно было наблюдать визуально по кровенаполненности вен уха и гиперемии слизистых оболочек глаз.

Аллометрические зависимости объема межклеточной жидкости у «прикрепленных» и «вывешенных» животных (рис. 8) имели общий  $Y_0=1.02\pm 0.09$  ( $F(1,37)=1.21$ ,  $p=0.2795$ ), но различные показатели степени:  $N=0.632\pm 0.030$  у «прикрепленных» и  $0.720\pm 0.014$  у «вывешенных» особей ( $F(1,37)=6.75$ ,  $p=0.0134$ ). Большой показатель аллометрической зависимости объема межклеточной жидкости для вывешенных животных свидетельствует о более выраженном его увеличении у более крупных животных, иными словами, - увеличение объема межклеточной жидкости при моделировании воздействия микрогравитации зависит от размера тела.



**Рисунок 8.** Концентрация эритроцитов (RBC) у «прикрепленных» (ATT) и «вывешенных» (HLU) мышей, крыс и кроликов (А) и log-log анализ зависимости RBC от массы тела (Б); объем крови, нормированный на массу тела (В), и представленный как зависимость от массы тела (Г); поправленные на массу тела величины объема межклеточной жидкости (Д) и его зависимость от массы тела (Е). \* –  $p < 0.05$ , тест Силека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена актуальной проблеме адаптации сердечно-сосудистой системы млекопитающих к условиям микрогравитации и дезадаптационных послеполетных изменений, снижающих работоспособность. Согласно текущим представлениям, триггерным механизмом, запускающим комплекс адаптивных изменений в отсутствие гравитации у человека, является исчезновение веса крови и ее перераспределение в направлении головы. Наблюдаемые у космонавтов уменьшение объема крови, «космическая» анемия и, по-видимому, уменьшение объема межклеточной жидкости непосредственно влияют на системную гемодинамику и индуцируют ряд последующих морфо-функциональных изменений: уменьшение ударного объема, нарушения барорефлекторной регуляции, изменение тонуса стенок сосудов и т.д.. Существенный вклад в исследование этих механизмов вносят эксперименты на животных: - реальные космические полеты и эксперименты, моделирующие влияние микрогравитации.

В ходе выполнения диссертационной работы было проведено исследование гемодинамических реакций мышей в космическом полете, в период послеполетного восстановления и проанализирован вклад некоторых физиологических механизмов в

обнаруженные реакции, в том числе, в связи с размером тела. Основными изучаемыми феноменами в работе являлись параметры центральной гемодинамики (частота сердечных сокращений и артериальное давление) и адаптивное изменение жидкостных объемов (объем крови, плазмы, межклеточный объем) в ответ на антиортостатическое вывешивание.

В ходе диссертационной работы был предложен и обоснован подход к регистрации гемодинамических параметров мышей при произвольном беге в нестрессирующих условиях в колесе домашней клетки. На основании телеметрических данных ЧСС, а также с применением фармакологических инструментов, обоснована целесообразность применения этого метода для мышей, как наиболее информативного, поскольку в условиях классического бега на тредбане истинная реакция линейного повышения ЧСС на нагрузку маскируется стресс-реакцией.

В диссертационной работе представлены результаты непрерывной регистрации артериального давления у мелких грызунов (мышей) на всех этапах длительного космического полета и после его окончания. Анализ ЧСС и САД во время полета и в послеполетный период выявил дезадаптационные изменения в работе сердечно-сосудистой системы мышей, сходные с изменениями, описанными для человека. Поскольку у этих мелких животных градиент гидростатического давления практически не выражен, его исчезновение в условиях микрогравитации не может служить ведущей причиной адаптационных изменений сердечно-сосудистой системы. Этот вывод подчеркивает необходимость поисков других, независимых от размера тела механизмов приспособления ССС к условиям микрогравитации.

Блок модельных экспериментов диссертационной работы был проведен с целью анализа возможных механизмов гемодинамических реакции мышей в условиях микро- и гипергравитации. Были зарегистрированы гемодинамические параметры мышей при центрифугировании, воспроизводящем профиль стартовых перегрузок, с применением фармакологических инструментов. На основании полученных результатов и анализа литературы мы сделали вывод, что выраженная брадикардическая реакция при центрифугировании не обуславливается парасимпатическими воздействиями, либо вызванной стрессом реакцией замирания, а, по-видимому, обусловлена преимущественно вестибулярными влияниями на сердечно-сосудистую систему мелких грызунов [Gotoh и др., 2003; Abe и др., 2009].

В экспериментах на наркотизированных мышках показано, что быстрые гемодинамические реакции на перераспределение крови в направлении головы не сопровождаются выраженными изменениями в правожелудочковом давлении. Воздействие на кровотоки в грудной клетке изменением транслегочного давления также не привело к значительным гемодинамическим изменениям, сопоставимым с таковыми при гравитационном стрессе. Таким образом, предположение о наличии вклада изменения веса тканей в гемодинамические реакции мышей при действии линейных перегрузок в направлении «спина-грудь», наблюдавшиеся при запуске и спуске космического аппарата, не подтвердилось.

В рамках диссертационной работы была впервые исследована динамика изменения объема крови, гематологических параметров, содержания воды в тканях у мышей в модели вывешивания. Результаты сравнительно-физиологического эксперимента на объектах с разным размером тела (мышках, крысах и кроликах) подтвердили гипотезу о том, что некоторые механизмы адаптации (а именно изменение концентрации эритроцитов) сердечно-сосудистой системы к микрогравитации не зависят от размера тела (величины градиента гидростатического давления). Был впервые проведен анализ недельной динамики концентрации эритроцитов у этих животных в модели антиортостатического вывешивания и

обнаружено снижение этого показателя, что соотносится с динамикой параметров красной крови в условиях космического полета. Механизмы, обуславливающие независимую от размера тела эритропению, могут включать недостаточность кровоснабжения костного мозга у вывешенных животных, снижение эритропоза вследствие увеличения центрального венозного давления.

Таким образом, полученные в диссертационной работе результаты вносят вклад в понимание адаптационных процессов сердечно-сосудистой системы млекопитающих к изменению гравитационного фактора и ставят новые вопросы для дальнейшего изучения, в том числе с использованием обоснованного в данной работе сравнительно-физиологического подхода, позволяющего оценивать физиологические механизмы с учетом размеров организма. Среди «размер-независимых» механизмов адаптации ССС к условиям микрогравитации могут быть: 1) изменения транскапиллярного давления на микроциркуляторном уровне (Hagens и др), для которого характерны небольшие градиенты давления и небольшой по величине вклад исчезновения веса тканей. Тем не менее микроциркуляторные изменения могут повлиять на кровообращение в целом; 2) изменение гемодинамики малого круга кровообращения вследствие изменения формы грудной клетки, что сопровождается снижением внутригрудного и центрального венозного давлений; 3) значительные перестройки вестибулярной афферентации и проприоцепции, происходящие в условиях микрогравитации; 4) совокупность обнаруженных разными авторами орган-специфичных адаптаций кровотока также может приводить к изменениям центральной гемодинамики.

### **ВЫВОДЫ:**

1. Вживание телеметрических датчиков не оказывает существенного влияния на двигательную и поведенческую активность животных, что позволяет использовать данный метод регистрации артериального давления в комплексных экспериментах.

2. Для оценки гемодинамической стоимости бега целесообразной, информативной и воспроизводимой является регистрация гемодинамических параметров мышей в комфортных нестрессирующих условиях – в беговом колесе домашней клетки.

3. Длительный космический полет вызывает выраженную дезадаптацию сердечно-сосудистой системы мышей, сохраняющуюся и при возвращении в поле действия гравитационных сил.

4. Гемодинамические реакции мышей на перегрузку, по-видимому, обусловлены видо-специфичными вестибулярными влияниями на сердечно-сосудистую систему, а не «механическим» перераспределением крови в грудной клетке.

5. Кратковременное антиортостатическое положение не приводит к выраженным гемодинамическим реакциям. При длительном воздействии развиваются адаптивные изменения, сходные с крупными животными.

6. Снижение количества эритроцитов – один из независимых от размера тела механизмов адаптации сердечно-сосудистой системы к воздействию микрогравитации.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ. 03.06 по специальности физиология 03.03.01

1. А. А. Андреев-Андриевский, Б. С. Шенкман, А. С. Попова, О. Н. Долгов, К. В. Анохин, П. Э. Солдатов, О. Л. Виноградова, Е. А. Ильин, В. Н. Сычев. Экспериментальные исследования на мышах по программе полета биоспутника «БИОН-М №1».

- Авиакосмическая и экологическая медицина, 48(1):14–27, 2014. (Индексируется Scopus, РИНЦ=0.47).
2. Alexander Andreev-Andrievskiy, **Anfisa Popova**, Richard Boyle, Jeffrey Alberts, Boris Shenkman, Olga Vinogradova, Oleg Dolgov, Konstantin Anokhin, Daria Tsvirkun, Pavel Soldatov, Tatyana Nemirovskaya, Eugeny Ilyin, and Vladimir Sychev. Mice in bion-m 1 space mission: Training and selection. PLoS ONE, 9(8):1–15, 2014. (Индексируется Scopus, 5-year IF =2.766).
  3. A. A. Andreev-Andrievskiy, **A. S. Popova**, A. S. Borovik, O. N. Dolgov, D. V. Tsvirkoun, M. Custaud, O. L. Vinogradova. Stress-associated cardiovascular reaction masks heart rate dependence on physical load in mice. Physiology and Behavior, 132:1–9, 2014 (5-year IF =2.835).
  4. **А. С. Попова**, Е. А. Лагерева, А. А. Андреев-Андреевский. Реакция гематологических параметров и объема циркулирующей крови мышей на антиортостатическое вывешивание разной продолжительности. Авиакосмическая и экологическая медицина, 50(5):179–180, 2016. (Индексируется Scopus, РИНЦ=0.47).
  5. **Anfisa Popova**, Darya Tsvirkun, Oleg Dolgov, Konstantin Anokhin, Jeffrey Alberts, Evgeniia Lagereva, Marc-Antoine Custaud, Guillemette Gauquelin-Koch, Olga Vinogradova, and Alexander Andreev-Andrievskiy. Adaptation to a blood pressure telemetry system revealed by measures of activity, agility and operant learning in mice. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 85:29–37, 2017. (Индексируется Scopus, 5-year IF=2.380).
  6. Alexander Andreev-Andrievskiy, **Anfisa Popova**, Jean-Christophe Lloret, Patrick Aubry, Anatoliy Borovik, Daria Tsvirkun, Olga Vinogradova, Eugeny Ilyin, Guillemette Gauquelin-Koch, Claude Gharib. Bion-M 1: First continuous blood pressure monitoring in mice during a 30-day spaceflight. Life Sciences in Space Research, 13:19–26, 2017. (Индексируется Scopus, SJR=0.67).
  7. **А. С. Попова**, Е. А. Лагерева, О. Л. Виноградова, А. А. Андреев-Андреевский. Объем крови, ее клеточный состав и содержание воды в тканях мышей при антиортостатическом вывешивании. Авиакосмическая и экологическая медицина, 51(7):106–113, 2017. (Индексируется Scopus, РИНЦ=0.47).
  8. Alexander A. Andreev-Andrievskiy, **Anfisa S. Popova**, Evgeniia A. Lagereva, Olga L. Vinogradova. Fluid shift versus body size: changes of hematological parameters and body fluid volume in hindlimb-unloaded mice, rats and rabbits. Journal of Experimental Biology, 2018, doi:10.1242/jeb.182832. (Индексируется Scopus, 5-year IF =3.407)

Тезисы докладов международных и всероссийских конференций:

1. **Попова А.С.**, Лагерева Е.А., Андреев-Андреевский А.А. Изменение жидкостных объемов и гематологических параметров млекопитающих в зависимости от размеров тела в модели антиортостатического вывешивания. // XVI Конференция молодых учёных, специалистов и студентов, посвящённая 60-летию со дня запуска первого искусственного спутника Земли (Москва, 10 октября 2017).
2. **Popova A.S.**, Andreev-Andrievskiy A.A., Lagereva E.A., Vinogradova O.L. Changes of blood and body fluids in tail-suspended mice. // XXXVIII Annual International Gravitational Physiology Meeting (Звенигород, Россия, 28 мая - 2 июня 2017).
3. **Попова А.С.**, Лагерева Е.А., Андреев-Андреевский А.А. Реакция гематологических параметров и объема циркулирующей крови мышей на антиортостатическое вывешивание разной продолжительности. // XVI конференция по космической биологии и медицине (Москва, 5-7 декабря 2016).
4. **Попова А.С.**, Андреев-Андреевский А.А., Ллоре Ж.К., Вико Л., Виноградова О.Л., Гариб К. Реакции сердечно-сосудистой системы мышей на гравитационный стресс. // Международная конференция "Пилотируемое освоение космоса" (Королев, 24-26 мая 2016).
5. **Попова А.С.**, Лагерева Е.А. Перераспределение жидкости в теле мышей после антиортостатического вывешивания разной продолжительности. // Международная научная

- конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» (Москва, 11-15 апреля 2016).
6. **Попова А.С.** Реакции сердечно-сосудистой системы мышей на гравитационный стресс. // XIV Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 65-летию со дня рождения врача-космонавта Морукова Б.В. (Москва, 14 апреля 2015).
  7. **Попова А.С.** Кардиореспираторные реакции при изменении транслегочного давления у мышей. // XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, 13-17 апреля 2015).
  8. **Попова А.С.,** Лагерева Е.А. Двигательная активность мышей в ходе восстановления после 30-суточного космического полета на биоспутнике БИОН-М №1. // XIII Конференция молодых ученых, специалистов и студентов, посвященная 50-летию полета первого в мире врача-космонавта Егорова Б.Б. (Москва, 2014).
  9. **Попова А.С.,** Андреев-Андреевский А.А., Долгов О.Н., Alberts J., Лагерева Е.А., Виноградова О.Л. Состояние мышей в первый день возвращения после 30-суточного космического полета Бион-М1. // XV Конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием «Проект Бион-М1: результаты и перспективы экспериментов и исследований» (Москва, 2014).
  10. **Попова А.С.,** Андреев-Андреевский А.А., Цвиркун Д.В., Боровик А.С. ЧСС при нагрузочных тестах у мышей. // Новые подходы к изучению классических проблем. VII Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии мышц и мышечной деятельности (Москва, 2013).